

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

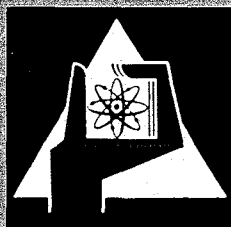
Dezember 1970

KFK 1335

Institut für Strahlenbiologie

Über die direkte Strahlenwirkung auf Desoxyribonucleinsäure

B. Kessler



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE



Kernforschungszentrum Karlsruhe

Dezember 1970

KFK 1335

Institut für Strahlenbiologie

Über die direkte Strahlenwirkung auf
Desoxyribonucleinsäure

Bernd Kessler

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	6
2.1. Biochemikalien	6
2.1.1. DNS-Präparate	6
2.1.2. Enzyme und ATP	7
2.2. Bestrahlungsbedingungen für:	7
2.2.1. SV40-DNS	7
2.2.2. Thymus-DNS, trocken	8
2.2.3. Thymus-DNS, in Lösung	9
2.3. Bruchanalyse	9
2.3.1. Zentrifugation von SV40-DNS	9
2.3.2. Zentrifugation von denaturierter Thymus-DNS	11
2.3.3. Bestimmung der Bruchhäufigkeit des Einzelstranges in der Thymus-DNS	13
2.4. Endgruppenbestimmung mit Polynucleotidkinase (PNK)	14
3. Ergebnisse	17
3.1. Bruchhäufigkeit an der SV40-DNS	17
3.2. Brüche und 5'-Endgruppen in bestrahlter DNS	20
3.2.1. Bestrahlung von trockener DNS	20
3.2.2. Bestrahlung von DNS-Lösungen	21
4. Diskussion	22
4.1. Einzelstrangbrüche in trocken bestrahlter DNS	22
4.2. Chemische Reaktionen am Einzelstrangbruch	25
4.3. Ereignisse bei der primären Wechselwirkung der Strahlung mit der DNS	27
5. Zusammenfassung	31
6. Literatur	33
7. Tabellen und Abbildungen	38

1. Einleitung

Ein Teil der vielfältigen Wirkungen ionisierender Strahlen, wie z.B. Röntgen- oder γ -Strahlen, liegt in der Schädigung der Erbsubstanz der Desoxyribonucleinsäure, welche sich beispielsweise in der Entstehung von Mutationen, von Chromosomenaberrationen oder in der Hemmung der Vermehrungsfähigkeit von Zellen manifestiert. Biochemische Untersuchungen über den Mechanismus der Strahlenschädigung in der DNS sind deshalb wichtig für die Erklärung biologischer Strahlenwirkung (vgl. auch Dertinger und Jung, 1969, Kapitel 10 - 14). Unter den Strahlenschäden an der DNS sind vor allem die chemische Veränderung der Nukleotidbasen und die Entstehung von Brüchen in der Nukleotidkette zu nennen. Es hat sich nun gezeigt, daß nicht nur die Basenschäden, sondern auch die eben genannten Brüche die biologischen Funktionen der DNS erheblich beeinträchtigen. Dies wurde an einfachen Modellsystemen wahrscheinlich gemacht, wie z.B. an der enzymatischen RNS-Synthese mit RNS-Polymerase und bestrahlter DNS als Matrix (Hagen u.a., 1970), oder an bestrahlten Bakteriophagen, deren Vermehrungsfähigkeit mit der Entstehung von Brüchen in ihrer DNS verglichen wurde (Freifelder, 1965; Bohne u.a., 1970). Es ist deshalb von Interesse, etwas über die chemischen Reaktionen zu erfahren, die zum Strangbruch in der DNS führen. Entsprechende Untersuchungen wurden bisher an verdünnten DNS-Lösungen durchgeführt. Die entscheidenden Agentien sind hierbei die aus dem Wasser entstehenden

Radikale OH^\bullet ; H^\bullet und die solvatisierten Elektronen. Man bezeichnet dies als indirekte Strahlenwirkung, weil der Strahleneffekt auf die DNS durch die genannten Agentien auf indirekte Weise zustande kommt. Im Gegensatz dazu ist bei der Bestrahlung von Zellen aber noch zusätzlich die Wirkung der Strahlenenergie zu berücksichtigen, die unmittelbar in der DNS selbst absorbiert und deshalb als direkte Strahlenwirkung bezeichnet wird. Man kann sie studieren, indem man isolierte DNS in trockener Form bestrahlt.

In der folgenden Arbeit soll nun die Entstehung von Strangbrüchen durch die direkte Strahlenwirkung untersucht werden. Ausgegangen wurde dabei von einigen Beobachtungen, die nach Bestrahlungen von DNS-Lösungen gewonnen wurden, und es war zu prüfen, ob sich Ähnliches auch nach Bestrahlung trockener DNS zeigen würde. Im Folgenden seien die nach indirekter Bestrahlung gemachten Beobachtungen kurz geschildert.

In einem doppelsträngigen nativen DNS-Molekül entstehen nach Bestrahlung in wässriger Lösung zunächst nur Brüche der einen Nukleotidkette, die jedoch keine Änderung des DNS-Molekulargewichtes zur Folge haben. Erst wenn die Einzelstrangbrüche so häufig geworden sind, daß sie sich gegenüberliegen oder doch zumindest nicht weit voneinander entfernt sind, bricht auch die doppelsträngige DNS-Kette. Anhand des Molekulargewichtes kann man die Zahl dieser Doppelstrangbrüche bestimmen. Will man zur Quote

der Einzelstrangbrüche gelangen, so sind die beiden Nukleotidketten durch schonende Denaturierung zu trennen und ihre Kettenlänge mittels des Molekulargewichtes des Einzelstranges zu ermitteln. Die Kinetik der Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche in Beziehung zur Dosis wurde von Hagen (1967) und von Coquerelle u.a. (1969) beschrieben. Die Häufigkeit der Einzelstrangbrüche steigt linear, die der Doppelstrangbrüche quadratisch mit der Dosis an.

Vergegenwärtigt man sich die Struktur der DNS-Kette (Abbildung 1), so wird deutlich, daß ein Bruch dieser Kette einmal dadurch zustande kommen kann, daß die Phosphoresterbindung zur Desoxyribose gespalten wird. Verbleibt das Phosphat am C'-5-Atom der Desoxyribose und verliert dadurch die Bindung zum C'-3-Atom des nächsten Zuckers, so ist dieses Bruchende durch eine 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe gekennzeichnet. Das ist etwa dann der Fall, wenn man DNS mit Desoxyribonuclease I abbaut. Umgekehrt ist aber auch eine Phosphoresterspaltung am 5'-Ende möglich, aus der 5'-OH- und 3'-Phosphatgruppen resultieren. Da es nach Bestrahlung außerdem zur Oxydation am Zucker kommen kann, würden in diesem Falle eine 5'-Phosphatgruppe und auf der anderen Seite ein veränderter Zucker gebildet werden.

5'-OH-Gruppen lassen sich spezifisch mit dem Enzym Polynucleotidkinase nachweisen, welches auf diese Endgruppen das endständige Phosphat des ATP überträgt. Ist in diesem ATP das γ -Phosphat radioaktiv (z.B. durch ^{32}P), so geben

nach der Enzyminkubation die in der DNS befindlichen markierten Endgruppen die Zahl der 5'-OH-Gruppen wieder. Behandelt man eine DNS, welche 5'-Phosphatendgruppen trägt, mit Phosphomonoesterase, so lassen sich die dadurch entstandenen 5'-OH-Gruppen ebenfalls mit Polynucleotidkinase nachweisen. Untersucht man also eine DNS-Probe vor und nach Phosphomonoesterasebehandlung mit Polynucleotidkinase, so ergeben sich daraus die Zahlen der 5'-OH- und die der 5'-Phosphatgruppen. Will man diese mit der Zahl der Bruchenden vergleichen, so bestimmt man gleichzeitig das Molekulargewicht der Einzelstränge, also der denaturierten DNS. Mit dieser Methode haben Bopp und Hagen (1970) die Endgruppen von in Lösung bestrahlter DNS bestimmt. Es zeigte sich, daß etwa 90 % der unmittelbar durch die Bestrahlung gebildeten Bruchenden 5'-Phosphatgruppen und etwa 10 % 5'-OH-Gruppen waren. Über das 3'-Ende konnten dagegen keine Aussagen gemacht werden.

Weiter ergab sich, daß zusätzlich Einzelbrüche entstehen, wenn man die bestrahlte DNS mit Alkali behandelt. Die Bruchhäufigkeit steigt ungefähr um den Faktor 1,5 an, wobei die so entstandenen Endgruppen fast ausschließlich 5'-Phosphatgruppen tragen. Einen entsprechenden Alkali-induzierten Bruch beobachtet man auch, wenn man RNS oder Apurinsäure mit Alkali behandelt. Entscheidend hierfür ist die in α - oder β -Stellung zur Phosphoresterbindung stehende freie OH-Gruppe (vgl. Brown und Todd, 1952). Es ist deshalb wahrscheinlich, daß in der bestrahlten DNS einige Desoxy-

ribosemoleküle oxydiert werden oder daß der Furanosering geöffnet wird, ohne daß zunächst die Phosphat-Zuckerkette bricht. Einzelheiten über solche Reaktionen sind jedoch noch nicht bekannt.

Im Gegensatz zur indirekten Strahlenwirkung, die durch einzelne Radikale des Wassers, vor allem OH^\bullet , zustande kommt, werden bei der direkten Absorption von Strahlenenergie bei einer primären Wechselwirkung im Mittel 60 eV absorbiert, die für mehrere chemische Reaktionen ausreichen (vgl. Dertinger u. Jung, 1969, Kap. 4). Es war nun zu prüfen, ob diese mit durchschnittlich 60 eV stattfindenden Primärionisationen in bestrahlter, trockener DNS zu ähnlichen chemischen Reaktionen führen würden, wie sie sich bei in Lösung bestrahlter DNS gezeigt hatten. Neben den pro absorbiertem Dosis entstehenden Brüchen interessierte dabei zunächst, ob sich auch bei trocken bestrahlter DNS Alkali-induzierte Brüche zeigen würden. Weiter war wichtig, ob die durch direkte Strahleneinwirkung entstandenen Brüche ebenso wie die durch indirekte Wirkung entstandenen zum größten Teil 5'-Phosphatgruppen tragen würden. Die Frage nach der Alkalilabilität der trocken bestrahlten DNS untersuchten wir an der Superhelixform der doppelsträngigen, zirkulären SV40-DNS. Sie wird bereits durch einen einzigen Bruch in einer ihrer Nukleotidketten zur offenen Ringform umgewandelt, ein Faktum, welches sich in einer Änderung ihres Sedimentationsverhaltens äußert. Die Natur der 5'-Endgruppen wurde durch die Poly-

nucleotidkinase festgestellt. Da für diese Versuche größere Mengen an DNS benötigt wurden, verwendeten wir hier trockene, im Vakuum bestrahlte Thymus-DNS.

2. Material und Methoden

2.1. Biochemikalien

2.1.1. DNS-Präparate

Die native DNS des Papillome erzeugenden Virus SV40 besteht aus ringförmigen, doppelsträngigen Molekülen in einer überdrehten Ringform (supertwisted helix oder auch superhelix genannt) und hat ein Molekulargewicht von etwa $2,9 \cdot 10^6$ (Bauer und Vinograd, 1970). Diese Form der SV40-DNS wird als Komponente I bezeichnet. Nach einer Denaturierung, z.B. im stark alkalischen Milieu, nimmt die DNS die Form einer zyklischen Spirale an. Sowohl die Superhelixform als auch die zyklische Spiralform sind vollkommen geschlossene Moleküle, die kein freies Ende besitzen. Die beiden Nukleotidstränge trennen sich deshalb in alkalischer Lösung nicht, weil kein freies Ende vorhanden ist, an dem die Strangtrennung beginnen könnte (Follett und Crawford, 1968; Vinograd u.a., 1968). Ein oder mehr Brüche in einer Einzelkette wandeln jedoch die Superhelixform in einen doppelsträngigen, offenen Ring um, der hier als Komponente II bezeichnet wird (Abbildung 2). Die SV40-DNS wurde uns von Dr. Petersen, Freiburg, überlassen. Die verwendete Kalbsthymus-DNS wurde nach dem Verfahren von Kay u.a. (1951) isoliert und enthielt weniger als 1 %

Protein, bestimmt nach Lowry u.a. (1951). Heringssperma-DNS bezogen wir von der Fa. Serva, Heidelberg.

Abbildung 2

2.1.2. Enzyme und ATP

Phosphomonoesterase aus Milz (EC 3.1.3.2) wurde von Dr. Bernardi, Strassburg, und die Polynucleotidkinase von Dr. Bopp, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt. Die Isolierung der Polynucleotidkinase erfolgte nach der Methode von Richardson (1965), es wurde Fraktion V mit einer Enzymaktivität von 4000 U/mg Protein verwendet. (γ -³²P) ATP bezogen wir vom "Radiochemical Centre", Amersham und ATP von Boehringer, Mannheim.

2.2. Bestrahlungsbedingungen für:

2.2.1. SV40-DNS

Um die gewünschten Versuchsbedingungen zu erhalten, wird die SV40-DNS, Komponente I, einer Gefriertrocknung unterzogen. Pro Versuchsanordnung werden zunächst 0,01 ml DNS-Lösung von 21 µg/ml in 0,015 m NaCl auf mikroskopische Deckgläser eines Durchmessers von 12 mm aufpipettiert. Diese bringt man dann auf ein tiefgekühltes Blech, um ein sofortiges Gefrieren der DNS-Lösung zu gewährleisten. Die Apparatur, in der die so vorbereitete DNS gefrieretrocknet wird, besteht aus einem Exsiccator, der an eine Vakuumpumpe angeschlossen ist. Die Deckgläschen mit der DNS befinden sich auf Kühlrippen aus Messing, welche von außen mit

Trockeneis und Aceton auf -78°C abgekühlt werden. Die Gefriertrocknung erfolgt dann bei 10^{-2} Torr, wobei sich die Temperatur der die Plättchen umgebenden Flächen langsam erhöht. Nach Erreichen einer Temperatur von ca. $+10^{\circ}\text{C}$ können die trockenen Proben entnommen werden.

Die Deckgläschen, auf deren Oberseite sich nun die gefriergetrocknete DNS befindet, werden zu je drei oder vier in Drahtspiralen eingeklemmt, um sie ohne Beschädigung in Glasampullen einführen zu können. Diese werden anschließend an einem Ende zugeschmolzen und auf 10^{-2} Torr evakuiert.

Nach dem Abschmelzen der evakuierten Ampullen erfolgt die Bestrahlung im Eisbad mit einer Cobalt- γ -Quelle (Gammacell 220, Atomic Energy of Canada, Ltd.), deren Dosisleistung zur Zeit der Versuche bei $1 - 0,95$ Mrad/Stunde lag.

2.2.2. Thymus-DNS, trocken

Nachdem man je 10 mg trockene Thymus-DNS in Glasampullen eingewogen und auf 10^{-2} Torr evakuiert hat, werden die Ampullen anschließend abgeschmolzen. Wegen der für die Versuche erforderlichen hohen Dosen erfolgte die Bestrahlung mit einem Elektronenlinearbeschleuniger (Fa. Varian, Typ V 7703). Die erforderlichen Bestrahlungen führte freundlicherweise Herr Rudolf vom Institut für Strahlentechnologie, Karlsruhe, aus.

2.2.3. Thymus-DNS, in Lösung

Verwendet wird die gleiche DNS wie bei der Trockenbestrahlung. Im unbestrahlten Zustand wird sie in 0,01 m NaCl aufgelöst und auf eine Konzentration von 450 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt. Je 3 ml werden für etwa 5 Minuten mit N_2 gesättigt und im Eisbad mit der Cobalt- γ -Quelle bestrahlt.

2.3. Bruchanalyse

2.3.1. Zentrifugation von SV40-DNS

Die verschiedenen Zentrifugationen für SV40- und Thymus-DNS wurden alle mit einer analytischen Ultrazentrifuge (Modell E, Fa. Beckman Instruments), ausgerüstet mit Absorptionsoptik und Scanningsystem, durchgeführt. Absorptionsoptik bedeutet, daß die Konzentration der Lösung in der Zentrifugenzelle durch Absorptionsmessung, für unsere Versuche bei 265 nm Wellenlänge, bestimmt werden kann. Scanningsystem heißt, daß die Extinktionsunterschiede zwischen Lösung und Lösungsmittel in den beiden Sektoren der Zelle durch eine sie schrittweise ausleuchtende Photozelle auf einen Schreiber übertragen werden. Nach Bestrahlung werden die Glasplättchen mit der gefriergetrockneten SV40-DNS einzeln auf einen Objektträger gesetzt und je 0,01 ml H_2O hinzugegeben. Zur vollständigen Auflösung der DNS ist eine Wartezeit von einer Stunde ausreichend. Um ein vorzeitiges Austrocknen zu verhindern, befindet sich der Objektträger in einer feuchten Kammer.

Die geeignete Methode zur Untersuchung der SV40-DNS ist die der Bandzentrifugation. Sie erlaubt einmal, trotz der geringen zur Verfügung stehenden DNS-Menge von 0,2 μ g, eine hinreichend genaue Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten, und zum anderen eine Trennung von Molekülen mit unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten. Dabei kann man aus der Größe der vom Scanner aufgezeichneten Flächen die relativen Anteile der verschiedenen Fraktionen berechnen. Verwendet wurden wie bei der später zu beschreibenden Gradientenzentrifugation 12 mm Aluminiumzellen, die jedoch ein besonderes "band-forming" Mittelstück enthalten. Dieses besitzt neben einem der beiden Sektoren eine kleine, ca. 15 μ l fassende, kreisrunde Kammer, die durch eine Kapillare mit dem Sektorraum in Verbindung steht. Für die Versuchsreihen im neutralen Milieu werden in die Sektoren als Lösungsmittel 4 % Saccharose, 0,05 m NaCl, 0,00625 m Phosphatpuffer eingefüllt, für die im alkalischen Milieu 4 % Saccharose, 0,2 m NaOH und 0,02 m Na-Citrat (pH = 12,5). Die 0,01 ml DNS werden in die kleine Probenkammer gegeben und gelangen, bedingt durch die Zentrifugalbeschleunigung, durch die Kapillare zunächst auf den Meniskus der Saccharose-Salz-Lösung, um anschließend als Band durch diese hindurch bis auf den Boden des Sektors zu wandern. Entscheidend für eine gute Trennung der Komponenten ist, daß das Lösungsmittel der DNS eine viel geringere Dichte besitzt als die Saccharoselösung im Sektorraum, da sich sonst die DNS rasch mit dieser vermischen und nicht mehr als

"Band" durch die Zelle laufen würde. Die Berechnung der Sedimentationskoeffizienten erfolgte auf die übliche Weise (z.B. nach Elias, 1961), zur Umrechnung der gemessenen S-Werte (S_{LM}) auf die $S_{20,W}$ -Werte wurde als Korrekturfaktor für die Saccharoselösung 1,082 ermittelt. Beispiele für die Aufzeichnung einer solchen Bandzentrifugation zeigen die Abbildungen 3 und 4; eine gute Trennung der beiden Komponenten, die eine zuverlässige Auswertung der Anteile der einzelnen Fraktionen erlaubte, war in der Regel bereits 40 Minuten nach der Überschichtung erreicht.

Abbildung 3

Abbildung 4

2.3.2. Zentrifugation von denaturierter Thymus-DNS

Die im trockenen Zustand bestrahlte Thymus-DNS wird in NaCl-Lösung unter Zugabe von NH_4OH (Endkonzentration 1 n) aufgelöst. (0,78 ml 12,84 n NH_4OH + 9,22 ml 0,01 m NaCl + 10 mg DNS). Dieser Vorgang dauert mehrere Stunden. Anschließend erfolgt die Neutralisierung der Lösung mittels einer Dialyse gegen 0,01 m NaCl (pH = 7), wobei die Salzlösung verschiedene Male gewechselt werden muß, um ein vollständiges Austreten des Ammoniak zu gewährleisten. Um die entstandenen Brüche des Einzelstranges bestimmen zu können, muß die DNS denaturiert werden, nachdem man zuvor ihre Konzentration auf 100 $\mu g/ml$ eingestellt hat. Zur Konzentrationsbestimmung wird die Extinktion bei 260 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von 22,0 cm^2/mg

verwendet. Die Denaturierung erfolgt nach dem Verfahren von Davison u.a. (1964):

- 1 ml DNS-Lösung (100 $\mu\text{g/ml}$), gelöst in 0,2 m NaCl und 0,025 m Phosphatpuffer

wird mit

- 1 ml 0,2 m NaOH gemischt. Nach drei Minuten erfolgt die Zugabe von

- 1 ml 10 % CHOH, welches kurz zuvor erhitzt wurde. Mit

- 0,125 Teilen 1 m KH_2PO_4 wird neutralisiert und mit

- 0,4 m NaCl + 0,05 m Phosphatpuffer auf 5 ml aufgefüllt.

Die Endkonzentration der DNS beträgt dann 20 $\mu\text{g/ml}$.

Zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten benutzt man die Gradientenzentrifugation, ausgeführt mit einer 12 mm Aluminium-Doppelsektorzelle. In den einen Sektor des Mittelstückes wird die DNS-Lösung eingefüllt, in den anderen das Lösungsmittel (0,2 m NaCl, 0,025 m Phosphatpuffer, 2 % CHOH). Die jeweilige Position des Sedimentationsgradienten der DNS-Lösung wird hierbei zu verschiedener Zeit beobachtet, und die Sedimentationskoeffizienten werden nach dem üblichen Verfahren berechnet.

Die in Lösung bestrahlte Thymus-DNS unterliegt nach der Bestrahlung den gleichen Versuchsbedingungen wie die im trockenen Zustand bestrahlte. Den einzigen Unterschied bildet lediglich die Alkalibehandlung, die sich hier auf eine Einwirkung von NH_4OH (Endkonzentration 1 n) während der Dauer von 30 Minuten bei 37 °C beschränkt. Anschließend wird, wie oben beschrieben, dialysiert.

2.3.3. Bestimmung der Bruchhäufigkeit des Einzelstranges in der Thymus-DNS

Aus der Gradientenzentrifugation der denaturierten DNS ergibt sich der Sedimentationskoeffizient $S_{20,W}^0$, der sich mit Hilfe einer empirischen Gleichung in das mittlere Molekulargewicht umwandeln läßt (Eigner u. Doty, 1965; Hagen, 1967; Weinert, 1967).

$$S_{20,W}^0 = 0,055 \cdot M^{0,38} \quad (1)$$

Man erhält dabei jedoch nur das Gewichtsmittel des Molekulargewichtes, M_w . Für die Berechnung der Zahl der Brüche benötigt man jedoch noch zusätzlich das Zahlenmittel des Molekulargewichtes, M_n . Eine Bestimmung dieser beiden Mittelwerte ist möglich, wenn man aus der Form des Gradienten in der Zentrifugenzelle eine Verteilung der Sedimentationskoeffizienten der verschiedenen Molekülgrößen berechnet. Die Sedimentationsverteilung läßt sich dann mit Hilfe der Gleichung (1) in eine Molekulargewichtsverteilung umwandeln, aus der dann M_w und M_n ermittelt werden können nach:

$$M_w = \sum m_i \cdot M_i \quad (2)$$

$$M_n = 1/\sum(m_i/M_i) \quad (3)$$

Dabei bedeutet M_i das Molekulargewicht einer bestimmten Fraktion und m_i den relativen Massenanteil dieser Fraktion. Einzelheiten dieses mit einem Rechner IBM 7074 durchgeführten Verfahrens sind bei Coquerelle u.a. (1969) beschrieben.

Aus dem Vergleich des Molekulargewichtes, einmal vor der Bestrahlung $[(M_w)_0$ und $(M_n)_0]$, und zum anderen nach einer bestimmten Dosis $[M_w$ und $M_n]$, wird nun die Bruchhäufigkeit des Einzelstranges B_1 pro Nukleotid berechnet:

$$B_1 = 2m [2/M_n - 1/M_w - 2/(M_n)_0 + 1/(M_w)_0] / 3 \quad (4)$$

Hierbei ist m das durchschnittliche Molekulargewicht eines Nukleotids (= 308 für Thymus-DNS). Auf diese Weise werden die sich in der trocken bestrahlten DNS gleichzeitig ereignenden Vernetzungen berücksichtigt. Einzelheiten dieser Überlegungen finden sich bei Charlesby (1960) sowie bei Lücke u.a. (1970).

2.4. Endgruppenbestimmung mit Polynucleotidkinase (PNK)

Der nach Alkalibehandlung und Dialyse gegen 0,01 m NaCl nicht zur Gradientenzentrifugation benutzte Teil der Thymus-DNS wird anschließend mit Phosphomonoesterase (Endkonzentration 0,016 U/ml) in 0,5 m Acetatpuffer (pH = 5,35) 17 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Dabei werden die endständigen Phosphatgruppen, insbesondere das uns hier interessierende 5'-Phosphat, abgespalten. Das 5'-Ende der DNS-Ketten liegt dann als 5'-OH-Gruppe vor, welche durch die Polynucleotidkinase phosphoryliert werden kann.

Zur anschließenden Inaktivierung der Phosphomonoesterase (Deproteinisierung) vermischt man 1 Teil Isoamylalkohol - Chloroform (Verhältnis 1:5) mit 10 Teilen der DNS-Proben, schüttelt 5 Minuten lang, zentrifugiert und zieht die

organische Phase zusammen mit dem inaktivierten Enzym mittels einer Spritze ab. Nach Wiederholung dieses Verfahrens und anschließender Dialyse der DNS-Fraktion gegen 0,2 m KCl wird die DNS-Lösung sodann durch Hinzugeben von 0,2 m KCl auf eine Konzentration von 308 $\mu\text{g/ml}$ ($= 10^{-3}\text{m P}$) eingestellt. Die Endgruppenbestimmung wird nun mit dem Enzym Polynucleotidkinase (PNK) in Anwesenheit von [γ - ^{32}P] ATP vorgenommen. Das Enzym ersetzt nach der folgenden Gleichung spezifisch die 5'OH-Gruppen, die während der Alkali- und der Phosphomonoesterase-Behandlung entstanden waren, durch die radioaktiv markierten 5'P-Gruppen.



Die Technik der Inkubation mit PNK sieht folgendermaßen aus: In ein Gesamtvolumen von 0,3 ml werden eingesetzt (in μmol): Tris HCl (pH = 7,6), 20; MgCl_2 , 3; Mercapto-ethanol, 5; DNS-P, 0,1; [γ - ^{32}P] ATP, 0,02 mit einer Gesamtaktivität von ca. 5000 cpm. Mit etwa 1 U PNK wird die Reaktion gestartet und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Wasserbad bei 37 °C erfolgt das Abstoppen der Reaktion mit 0,1 ml gesättigter $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -Lösung. Es schließt sich an die Zugabe von 0,1 ml DNS aus Heringsperma (5 mg/ml) als Träger-DNS für die nachfolgende Fällung mit 0,5 ml Trichloressigsäure (1 m). Nach einer Inkubation von 10 Minuten im Eisbad wird der entstandene Niederschlag auf Membranfiltern (Sartorius, SM 11303) gesammelt, indem die Proben mittels einer Vakuumpumpe hindurchgesaugt und durch zweimaliges Nachwaschen mit 1 %

Trichloressigsäure von löslichen Rückständen befreit werden. Die Filter bringt man sodann einzeln in Glasfläschchen und trocknet sie 20 Minuten lang bei 100 °C. Nach dem Einfüllen von je 10 ml Scintillationsflüssigkeit pro Fläschchen kann die Radioaktivität eines jeden Filters in einem Scintillationsspektrometer (Tricarb, (Packard) Einstellung G 10) gezählt werden.

Neben den zu untersuchenden DNS-Proben enthielten 2 Teströhrchen keine DNS, sondern nur Testgemisch und PNK. Sie ergaben den Nullwert, der von den Zählwerten der verschiedenen DNS-Proben zu subtrahieren ist. Bezieht man die Gesamtmenge an eingebautem ³²Phosphat auf das Gesamtphosphat der eingesetzten DNS, so ergibt sich daraus die Häufigkeit der phosphorylierten 5'-Endgruppen pro Nukleotid.

Zur Kontrolle der jeweiligen Testbedingungen setzen wir jeweils 2 Teströhrchen mit einer DNS-Probe an, deren 5'-Endgruppen ausschließlich aus 5'-OH-Gruppen bestehen. Diese "5'OH-DNS" wird durch Degradierung von Thymus-DNS mit Micrococcusnuclease nach Novogrodsky und Hurwitz (1966) hergestellt. Die Kettenlänge dieser DNS wurde durch Sedimentationsanalyse bestimmt; bei der verwendeten Probe betrug die Kettenlänge der Einzelstränge 106 Nukleotide (Zahlenmittel P_n). Einzelheiten dazu sind bei Bopp und Hagen (1970) beschrieben. Es wurde nun geprüft, ob bei dem jeweiligen Inkubationsansatz aus der Zahl der phosphorylierten Endgruppen an 5'OH-DNS diese Kettenlänge errechnet

werden konnte. Es ergaben sich dabei bei den verschiedenen Versuchsansätzen 85 - 106 5'OH-Gruppen pro 10^4 Nukleotide; einer Kettenlänge von 94 - 118 entsprechend. Bei Abweichungen über 10 % vom erwarteten Wert wurden die Einbau-raten bei den bestrahlten Proben entsprechend der etwas geringeren Enzymaktivität der Polynucleotidkinase korri-giert.

3. Ergebnisse

3.1. Bruchhäufigkeit an der SV40-DNS

Berechnet man die Sedimentationskoeffizienten der beiden Fraktionen, so ergibt sich für Komponente I ein $S_{20,W}$ von 22,4 und für Komponente II ein solcher von 17,9. Dieser Unterschied ermöglichte eine vollständige, vom Scanner aufgezeichnete Trennung und damit eine genaue Auswertung der Anteile beider Molekülarten (vgl. auch die Abbildungen 3 und 4).

Versuchsbedingungen waren einmal die Zentrifugation im neutralen und zum anderen die im alkalischen (pH = 12,5) Milieu. Ausgegangen wurde dabei von einer DNS-Lösung, die nur die Komponente I enthielt. Es zeigte sich, daß durch die oben geschilderten Versuchsbedingungen (Gefriertrocknung und Auflösen), auch ohne Bestrahlung bereits rund die Hälfte der Superhelixform in die Komponente II übergegangen war. Im alkalischen Saccharosegradienten gefahrene Proben, ebenfalls noch unbestrahlt, wiesen sogar nur mehr einen Anteil von ungefähr 25 % an Komponente I auf.

Bestrahlt wurde mit Dosen zwischen 50 und 500 Krad. Bei der höchsten Dosis waren sämtliche Moleküle der Komponente I verschwunden, d.h. also, jedes Molekül der Komponente I wurde durch mindestens einen Bruch in einer Einzelkette in den doppelsträngigen Ring der Komponente II umgewandelt. Außerdem erzeugte die alkalische Behandlung der zuvor getrockneten DNS allein noch zusätzlich Brüche. Die nach den verschiedenen Bestrahlungsdosen erhaltenen Anteile der Komponente I sind in der Tabelle I zusammengestellt. Da wir je nach Präparation der Proben bei den einzelnen Versuchsserien verschiedene Kontrollwerte erhielten, wurden die Dosiseffektkurven für jede Serie gesondert aufgezeichnet.

Tabelle I

Abbildung 5

Die Neigung jeder einzelnen Dosiseffektkurve wurde durch Regressionsanalyse berechnet. Da sie sich nur wenig voneinander unterschieden, konnte eine gemeinsame Neigung der Kurven ermittelt werden. Abbildung 6 zeigt, für jede Versuchsserie getrennt, den nach verschiedenen Dosen erhaltenen Anteil der Komponente I, bezogen auf den ohne Bestrahlung, und die sich aus den einzelnen Werten ergebenden gemeinsamen Regressionsgeraden für die Zentrifugation im neutralen und alkalischen Milieu. Aus allen Werten zusammen wurde die Fehlergrenze der Neigung berechnet ($a_{\text{neutral}} = -0,00149 \pm 0,000042$; $a_{\text{alkal.}} = 0,00125 \pm 0,000147$).

Abbildung 6

Die beiden Regressionsgeraden unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($t = 1,55$). Das bedeutet also, daß, obwohl durch die Alkalibehandlung zunächst einmal eine größere Bruchrate entstanden war, die Anzahl der durch die Bestrahlung entstandenen Brüche der im neutralen Saccharosegradienten beobachteten annähernd gleich ist. Im alkalischen Milieu ist sogar eher eine geringere Bruchrate festzustellen als unter neutralen Versuchsbedingungen. Aus der Neigung der Regressionsgeraden ergibt sich ferner die D_{37} , worunter man die Dosis versteht, bei der nur noch 37 % der ursprünglich vorhandenen Moleküle der Komponente I nachgewiesen werden können, die übrigen sind in die Komponente II übergegangen. Bei dieser Dosis hat im Mittel jeweils ein Einzelstrangbruch pro Molekül stattgefunden. Es ergab sich als D_{37} im neutralen Milieu: 290 ± 20 Krad, und als D_{37} im alkalischen Milieu: 350 ± 41 Krad. Aus der D_{37} läßt sich der G-Wert für den Einzelbruch berechnen, der die Zahl der Einzelbrüche pro 100 eV absorbiertes Energie ($6,24 \cdot 10^{13}$ eV/rad) angibt. Dabei wird nach dem folgenden Schema vorgegangen:

$$N/M_0 = \text{Moleküle pro g}$$

$$\text{Moleküle pro g}/D_{37} \text{ in rad} = \text{Ereignisse pro g und rad,}$$

wobei

N = Loschmidtsche Zahl und

M_0 = Molekulargewicht der SV40-DNS = $2,9 \cdot 10^6$

sind.

Für den gesuchten G-Wert des Einzelstrangbruches (G_{ssb}) gilt dann:

$$G_{\text{ssb}} = \text{Ereignisse pro g und rad} / 0,624 \cdot 10^{12}$$

Die eingesetzten Zahlenwerte ergeben für:

a) Neutralen pH: $G_{\text{ssb}} = 1,13 \pm 0,08$

b) Alkalischen pH: $G_{\text{ssb}} = 0,94 \pm 0,10$

Damit ist also bewiesen, daß in der SV40-DNS, die trocken bestrahlt wurde, durch eine zusätzliche Alkali-Behandlung keine weiteren Einzelstrangbrüche mehr erzeugt werden konnten.

3.2. Brüche und 5'-Endgruppen in bestrahlter DNS

3.2.1. Bestrahlung von trockener DNS

Thymus-DNS wurde im Vakuum mit Dosen bis zu 60 Mrad bestrahlt, und die Zahl der Einzelstrangbrüche und die Natur der 5'-Enden in der beschriebenen Weise bestimmt. In Tab. II sind die einzelnen Meßdaten zusammengestellt, Abb. 7 zeigt die Mittelwerte für Einzelstrangbrüche und 5'-Phosphatgruppen in Abhängigkeit zur eingestrahnten Dosis. Es ergab sich eine lineare Zunahme mit der Dosis, sowohl für die Einzelbrüche als auch für die 5'-Phosphatgruppen. 5'-OH-Gruppen konnten nicht gemessen werden; d.h. eine Phosphorylierung des strahlenbedingten Bruchendes war ohne vorherige Phosphomonoesterasebehandlung nicht nachweisbar. Die beiden Dosiseffekturven zeigen eine verschiedene Neigung; das Verhältnis der beiden beträgt

0,22 zu 1,0, d.h. 22 % der Brüche haben 5'-Phosphatgruppen.

Tabelle II

Abbildung 7

3.2.2. Bestrahlung von DNS-Lösungen

In früheren Versuchen (Bopp und Hagen, 1970) wurde gefunden, daß etwa 90 % der strahlenbedingten Einzelstrangbrüche 5'-Phosphatgruppen tragen und etwa 10 % 5'-OH-Gruppen. In diesem Fall war jedoch die DNS in wässriger Lösung bestrahlt worden. Um unsere Befunde, die bei direkter Strahleneinwirkung erhalten worden waren, besser zu sichern, untersuchten wir in der gleichen Weise auch einige DNS-Proben, die in wässriger Lösung bestrahlt worden waren. Tabelle III und Abb. 8 zeigen die entsprechenden Ergebnisse. Die Zahl der 5'-OH-Gruppen wurde hierbei nicht gemessen, das nach Dephosphorylierung eingebaute ^{32}P -Phosphat gibt also die Gesamtzahl der 5'-Phosphat-Gruppen und der 5'-OH-Gruppen wieder. Obwohl die wenigen Werte eine größere Streuung zeigten als die der trocken bestrahlten DNS-Proben, ergab sich jedoch im Mittel für die Brüche die gleiche Häufigkeit pro Nukleotid wie für die 5'-Phosphat- und die 5'-OH-Gruppen ($1,44 \pm 0,24 \cdot [10^{-10}]$ gegenüber $1,36 \pm 0,04 \cdot [10^{-10}]$). Diese Beobachtung stimmt mit den früheren Ergebnissen von Bopp und Hagen (1970) überein. Die mit unserer Versuchsanordnung erhaltenen Resultate an trocken bestrahlter DNS können also als zuverlässig angesehen werden.

Tabelle III

Abbildung 8

4. Diskussion

4.1. Einzelstrangbrüche in trocken bestrahlter DNS

Einleitend wurde beschrieben, daß der durch ionisierende Strahlung hervorgerufene Bruch der Nukleotidkette die biologische Funktion der DNS erheblich zu beeinträchtigen vermag. Es war deshalb von Interesse, etwas über die strahlenchemischen Reaktionen zu erfahren, die zum Bruch des Nukleotidstranges führen. Die meisten Arbeiten darüber beschäftigen sich mit dem Einzelstrangbruch in einer DNS, die in wässriger Lösung bestrahlt wurde. Auch die dabei beteiligten chemischen Reaktionen wurden bisher nur nach einer solchen indirekten Strahlenwirkung untersucht. Da in Zellen die Strahlenenergie auch direkt in der DNS absorbiert wird, erschien es nützlich, auch den Einzelstrangbruch nach direkter Strahleneinwirkung näher zu untersuchen. In früheren Untersuchungen wurden Einzelstrangbrüche bisher nur in trockener Thymus-DNS bestimmt (Hagen und Wellstein, 1965; Lücke-Huhle u.a. 1970). In dieser DNS entstehen neben den Brüchen des Einzelstranges und des Doppelstranges noch zahlreiche Vernetzungen zwischen den Molekülen. Diese vernetzten Stränge können nur mehr zum Teil in Lösung gebracht werden; der Rest ist unlösliches Gel. In alkalischem Milieu, wenn sich die beiden komplementären Stränge voneinander trennen, gelingt es jedoch, die bestrahlte DNS in Lösung zu bringen, da sich zwischen den einzelnen Vernetzungen noch zahlreiche Einzelstrangbrüche befinden (Lücke-Huhle u.a., 1970). Die Ermittlung

der Einzelstrangbrüche nach verschiedenen Strahlendosen erfolgt dann durch eine Molekulargewichtsbestimmung der durch das Alkali denaturierten DNS-Moleküle (vgl. Abschnitt 2.3.3.). Für die Entstehung eines solchen Einzelstrangbruches in der trockenen Thymus-DNS wurde ein Energieaufwand von 140 eV errechnet, was einem G-Wert von 0,72 entspricht.

Will man die dabei notwendige Denaturierung der DNS vermeiden, so bietet sich die Untersuchung einer ringförmigen DNS an, wobei der Übergang von ihrer überdrehten Form (Superhelix) in die offene Ringform bestimmt wird. Dieser Übergang wird bereits durch einen einzigen Bruch im überdrehten DNS-Ring hervorgerufen, wobei sich die hydrodynamischen Eigenschaften in der DNS ändern. So nimmt der Sedimentationskoeffizient ab (Vinograd u.a., 1965) und die Viskosität zu (Opschoor u.a., 1968), entsprechend der Tatsache, daß das offene Ringmolekül viel mehr entfaltet ist und einen größeren Reibungskoeffizient besitzt als die dicht gepackte Superhelix.

Es gibt mehrere Viren, deren DNS in diesen beiden Formen vorliegen kann. Neben der DNS des SV40-Virus ist es die DNS des Polyoma Virus, die eingehend auf diese Eigenschaften hin untersucht wurde (Weil und Vinograd, 1963; Bloomfield, 1966). Weiter existiert auch die replikative Form (RF) des Phagen ϕ X-174 in der Zelle sowohl als Superhelix als auch als offene Ringform (zusammenfassende Darstellung bei Sinsheimer, 1968). Die Wirkung von ionisierender

Strahlung wurde an dieser DNS von Taylor und Ginoza (1967) untersucht. Hierbei wurde die Umwandlung von der Superhelix (Form I) in die zirkuläre Form (II) nach γ -Bestrahlung gemessen. Wässrige Lösungen von DNS wurden von diesen Autoren in flüssigem Stickstoff ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) bestrahlt, dabei wirkt nur die in der DNS selbst absorbierte Energie. Es schien uns jedoch nicht ausgeschlossen, daß auch Energie, die im gefrorenen Wasser absorbiert wird, auf die DNS übergeht. Wir bevorzugten deshalb die Bestrahlung von trockener DNS im Vakuum, um die direkte Strahlenwirkung auf die DNS zu testen.

Aus unseren Versuchen an bestrahlter SV40-DNS errechnete sich für den G-Wert zur Erzeugung eines Einzelstrangbruches $1,13 \pm 0,08$. Dieser Wert stimmt mit dem von Taylor und Ginoza (1967) an $\phi\text{X-174-RF-DNS}$ erhaltenen genau überein. Diese Autoren fanden 4,0 Einzelstrangbrüche pro DNS-Molekül ($3,4 \cdot 10^6$ Dalton) und pro Mrad, was nach der oben dargestellten Berechnungsweise einem G_{ssb} -Wert von 1,13 entspricht. Die Berechnung des G-Wertes hängt bei dieser Methode wesentlich von der Genauigkeit ab, mit der das Molekulargewicht der DNS bestimmt wird. Die entsprechenden Angaben für SV40-DNS sind unterschiedlich. Es werden Molekulargewichte zwischen $2,5 - 2,9 \cdot 10^6$ angegeben (Westphal, 1970; Bauer und Vinograd, 1970); wir benutzten hier in Übereinstimmung mit Westphal (persönliche Mitteilung) den uns am zuverlässigsten erscheinenden Wert von $2,9 \cdot 10^6$ (Bauer und Vinograd, 1970). Die gute Überein-

stimmung unseres G-Wertes für den Einzelstrangbruch mit dem von Taylor und Ginoza (1967) an ØX-174-RF-DNS ermittelten rechtfertigt unsere Annahme.

4.2. Chemische Reaktionen am Einzelstrangbruch

Im Gegensatz zu der Entstehung von Einzelstrangbrüchen in bestrahlten DNS-Lösungen können wir über die Reaktionen, die bei der Entstehung des Einzelstrangbruches nach direkter Strahleneinwirkung beteiligt sind, fast gar nichts aussagen. Aus unseren Versuchen können wir nur 2 Schlußfolgerungen ziehen:

- 1) Eine Alkali-Behandlung der bestrahlten DNS führt zu keiner Änderung der Bruchhäufigkeit
- 2) 22 % der 5'-Enden der strahlenbedingten Brüche tragen 5'-Phosphatgruppen, während 5'OH-Gruppen überhaupt nicht nachweisbar waren.

Bestrahlt man DNS in wässriger Lösung und bestimmt anschließend die Häufigkeit der Einzelstrangbrüche, so errechnet sich aus den Meßdaten ein G-Wert von 0,37 (Bopp und Hagen 1970). Bei diesen Versuchen wurde die bestrahlte DNS nachträglich einer Alkali-Behandlung unterworfen, um eine vollständige Strangtrennung zu gewährleisten. Dabei ist es unerheblich, ob die DNS in einsträngiger oder doppelsträngiger Form bestrahlt wurde. Ohne nachträgliche Alkali-Behandlung, die natürlich nur an einsträngiger DNS unterlassen werden kann, ist der G-Wert für den Einzelstrangbruch viel geringer, nämlich nur 0,25. Mit einer

Häufigkeit von $G_x = 0,12$ haben also Reaktionen an der Desoxyribose stattgefunden, die bei nachträglicher Alkalibehandlung zum Kettenbruch führen. Es wurde dabei diskutiert, daß jede Öffnung des Furanoseringes bereits zu dieser Labilisierung führt; als mögliche Ursache dafür kommt nach Bestrahlung die Abspaltung der Nukleotidbase oder auch eine Oxydation am C-4-Atom des Zuckers in Betracht.

Diese Reaktionen treten nun offenbar nach direkter Strahleneinwirkung nicht ein; d.h. Reaktionen, die zur Abspaltung der Base führen, schädigen den Zucker so stark, daß gleichzeitig auch die Nukleotidkette bricht. Auch eine Oxydation des C-4-Atoms würde auf jeden Fall die benachbarten Phosphoresterbindungen spalten. Dies erscheint denkbar, da ja bei der direkten Strahlenwirkung viel mehr Energie auf die Desoxyribose übertragen wird als bei dem Angriff eines einzelnen OH-Radikals auf die DNS bei Bestrahlung wässriger DNS-Lösungen. Wir müssen uns jedoch mit diesen kurzen Hinweisen begnügen, da z.B. über die Freisetzung von Nukleotidbasen nach direkter Strahleneinwirkung nichts bekannt ist.

Bei der Beurteilung der 5'-Endgruppen ergeben sich ähnliche Schlußfolgerungen. 22 % der Endgruppen nach direkter Strahleneinwirkung sind 5'-Phosphatgruppen; 5'-OH-Gruppen wurden nicht nachgewiesen. 78 % der 5'-Endgruppen waren somit mit Polynucleotidkinase nicht phosphorylierbar; weder vor oder nach einer Behandlung mit Phosphomono-

esterase. Dies bedeutet, daß die Zerstörung des Zuckers durch absorbierte Strahlenenergie so nachhaltig ist, daß definierte enzymatische Reaktionen an ihm nicht angreifen können, im Gegensatz zu den Veränderungen der Desoxyribose durch ein OH° -Radikal in Lösung. Über die Art der durch direkte Strahleneinwirkung erzeugten Veränderungen können jedoch an dieser Stelle keine weiteren Aussagen gemacht werden.

4.3. Ereignisse bei der primären Wechselwirkung der Strahlung mit der DNS

Die Häufigkeit des Einzelstrangbruches und der 5'-Phosphatgruppen wurde zuvor durch die Zahl der Ereignisse pro 100 eV absorbierte Energie angegeben. Bei Bestrahlung von wässrigen DNS-Lösungen führt die absorbierte Energie zur Bildung von Radikalen des Wassers, zu OH° - oder H° -Radikalen bzw. zu solvatisierten Elektronen, die ihrerseits die DNS zu schädigen vermögen. Die Veränderungen der DNS-Struktur sind hier also auf die verschiedenen Reaktionen dieser Radikale mit der DNS zu beziehen. Anders ist es bei Bestrahlung im Trockenen. Hier wird die Strahlenenergie direkt in der DNS absorbiert, wobei aber die abgegebenen Energiebeträge bei den einzelnen primären Wechselwirkungen ganz verschieden groß sind. Informationen über diese Energiebeträge lassen sich von zwei Seiten her gewinnen. Einmal dadurch, daß man den Energieverlust von Elektronen beim Durchgang durch dünne Materieschichten

unmittelbar bestimmt; zum anderen, daß man aus Nebelkameraufnahmen die Häufigkeitsverteilung der Ionenpaare pro Primärionisation auszählt und damit den Energiebetrag ermittelt, der bei der einzelnen Primärionisation abgegeben wird. Primärionisationen sind dabei diejenigen Energieverlustereignisse der Primär- und Sekundär-Strahlung in der Materie, bei denen es zur Bildung eines oder mehr Ionenpaare kommt.

Den Energieverlust von Elektronen in Materie bestimmten Rauth und Simpson (1964), indem sie 130 Å-dicke Folien von Formvar mit 20 keV-Elektronen bestrahlten und aus den Streudaten die Häufigkeit der verschiedenen Energieverluste pro primäre Wechselwirkung der Elektronen mit der Folie ermittelten. Diese Häufigkeitsverteilung der Energieabgabe ist in Abbildung 9, Spalte a schematisch dargestellt. Energieabgaben unter 10 eV sind sehr selten; bei der Hälfte aller primären Wechselwirkungen werden Energiebeträge zwischen 10 und 30 eV abgegeben, während nur bei 10 % aller Ereignisse mehr als 100 eV übertragen werden. Der Durchschnittswert für ein Energieverlustereignis beträgt 60 eV.

Man kann weiter überlegen, zu welche Folgeereignisse die Absorption dieser verschiedenen Energiebeträge hervorruft. Die abgegebene Energie führt einmal zu Anregungen, zum anderen zu Ionisationen. Das bei einer Ionisation freigesetzte Elektron kann gelegentlich genügend Energie erhalten, um in der Nähe des Orts seiner Entstehung

weitere Ionisationen auszulösen. Dadurch entstehen Primärionisationen, die aus mehreren Ionenpaaren entstehen.

Die Anregungen wollen wir hier nicht weiter berücksichtigen, da sie zu dem Strahleneffekt auf das Makromolekül nur wenig beitragen.

Ore und Larsen (1964) haben die Häufigkeitsverteilung der Ionenpaare pro Primärionisation aus Nebelkammeraufnahmen bestimmt. Diese Verteilung ist in Abbildung 9, Spalte b aufgezeichnet. 63 % aller Primärionisationen führen zur Bildung von nur einem Ionenpaar. Bei 20 % aller Wechselwirkungen entstehen 2 Ionenpaare; die Häufigkeit der Primärionisationen mit mehr Ionenpaaren nimmt dann laufend ab.

Zur Deutung unserer Befunde an der DNS gehen wir nun von der Annahme aus, daß je nach dem abgegebenen Energiebetrag bzw. je nach der Zahl der gebildeten Ionenpaare verschiedene chemische Reaktionen am Ort der primären Wechselwirkung stattfinden. Aus dieser Annahme läßt sich dann folgern, ein bestimmter molekularer Schaden erfordere die Erzeugung einer Primärionisation mit beispielsweise 2 Ionenpaaren oder entsprechend, er sei an die Abgabe der entsprechenden Energie gebunden (Dertinger u. Jung, 1969, Kap. 4). Es erschien uns deshalb möglich, die Häufigkeit der von uns an der DNS gemessenen Ereignisse mit der Häufigkeit der einzelnen primären Wechselwirkungen mit unterschiedlichem Energieverlust zu vergleichen. In Abbildung 9, Spalte 4 d und e ist dies schematisch darge-

stellt. Bei einem G-Wert von 1,13 pro Einzelstrangbruch ereignen sich 0,68 Einzelbrüche pro 60 eV, dem Durchschnittswert für ein Energieverlust-Ereignis.

Es ist nun anzunehmen, daß alle primären Wechselwirkungen mit hoher Energieabgabe immer zum Bruch führen, der Anteil von 0,68 wurde deshalb im Schema der Abb. 9 rechts angeordnet. Primärionisationen mit niedriger Energieabgabe führen dann nur mit geringer Wahrscheinlichkeit oder gar nicht zum Bruch. Dies ist verständlich, da mit kleinen Energien oder mit nur einem Ionenpaar entweder nur der Zucker oder nur die Nukleotidbase verändert wird und entsprechend die Ausbeute für den Bruch sinkt. Primäre Wechselwirkungen mit hoher Energieabgabe führen in jedem Fall zum Bruch; über die sich gleichzeitig ereignenden Reaktionen am Zucker oder an der Base können jedoch keine Angaben gemacht werden. Einige Hinweise dazu erhält man aus unseren Untersuchungen an den 5'-Endgruppen, die nur zu 22 % 5'-P-Gruppen tragen (Abb. 9, Spalte d). Bei den übrigen 5'-Endgruppen können weder mit Phosphomonoesterase Phosphatgruppen abgespalten werden, noch können 5'-OH-Gruppen durch die Polynucleotidkinase phosphoryliert werden. Diese Endgruppen sind durch die hohen absorbierten Energiebeträge so stark geschädigt, daß enzymatische Reaktionen an ihnen nicht mehr angreifen können.

Neben den von uns gemessenen Einzelstrangbrüchen und deren Endgruppen ist in Spalte c der Abbildung 9 noch die Häufigkeit von Doppelbrüchen eingezeichnet, die sich aus dem

von Lücke-Huhle u.a. (1970) gemessenen G-Wert von 0,13 ergibt. Hier ist ebenso wieder zu vermuten, daß Doppelbrüche nur durch primäre Wechselwirkungen mit hoher Energieabgabe bzw. mit Primärionisationen mit mehreren Ionenpaaren entstehen.

Im ganzen haben unsere Untersuchungen an der trocken bestrahlten DNS gezeigt, daß die chemischen Reaktionen nach direkter Strahleneinwirkung von denen nach indirekter Strahleneinwirkung ganz verschieden sind. Wenn auch die gleiche Veränderung der makromolekularen Struktur, wie z.B. der Bruch der Nukleotidkette, beobachtet werden, so müssen doch nicht die gleichen Reaktionen zu ihnen geführt haben. Die molekularen Schäden, die an der DNS durch direkte Strahlenwirkung entstehen, sind nach unseren Beobachtungen viel tiefgreifender und ausgedehnter. Es ist denkbar, daß sie in der bestrahlten Zelle zu einer größeren Beeinträchtigung der biologischen Funktion der DNS führen als die durch indirekte Strahlenwirkung entstandenen.

5. Zusammenfassung

In unserer Arbeit wurden Strahlenreaktionen an einer der direkten Bestrahlung ausgesetzten Desoxyribonukleinsäure untersucht. Einmal interessierte uns dabei die Frage, ob eine sich direkter Bestrahlung anschließende Alkalibehandlung zusätzliche Brüche erzeugen kann. Zu ihrer Beantwortung benutzten wir die auf Grund ihrer Struktur gut geeignete SV40-DNS.

Weiterhin interessierte die Natur der 5'-Enden der durch direkte Bestrahlung entstandenen Brüche. Hierzu gebrauchten wir trockene Thymus-DNS, die nach der Bestrahlung entweder nur mit Alkali oder aber zusätzlich noch mit Phosphomonoesterase behandelt wurde, um anhand der mit Polynucleotidkinase durchgeführten Endgruppenbestimmung einmal nur die 5'-OH- und zum anderen nur die 5'-Phosphatgruppen zu erhalten. Außerdem bestimmten wir mit den gleichen Methoden die Endgruppen, die sich bei Bestrahlung in Lösung ergaben. Zur Berechnung der Brüche dienten uns die Methoden an der analytischen Ultrazentrifuge.

Unsere Versuche ergaben, daß durch eine Alkalibehandlung nach vorheriger direkter Bestrahlung keine zusätzlichen Einzelstrangbrüche auftreten. Der G_{ssb} -Wert für neutralen pH betrug $1,13 \pm 0,08$ und der für alkalischen pH $0,94 \pm 0,10$. Die Frage nach dem Aussehen des 5'-Endes konnte dahingehend beantwortet werden, daß 22 % als 5'-Phosphatgruppen vorliegen, während 5'-OH-Gruppen nicht nachzuweisen waren. Die Versuche an in Lösung bestrahlter Thymus-DNS ergaben in guter Übereinstimmung mit früher gefundenen Ergebnissen, daß hier die Summe der 5'-Phosphat- und 5'OH-Gruppen gleich der Anzahl der Einzelstrangbrüche ist. Der geringe Anteil an 5'P-Gruppen nach direkter Bestrahlung ist also nicht auf eine ungenügende Versuchsanordnung zurückzuführen.

6. Literatur

Bauer, W. und J. Vinograd (1970)

Interaction of Closed Circular DNA with Intercalative Dyes.

II. The free Energy of Superhelix Formation in SV40-DNA.

J. Mol. Biol. 47, 419

Bloomfield, V.A. (1966)

Twisted circular DNA: Sedimentation Coefficients and the
Number of Twists.

Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 55, 717

Bohne, L., Th. Coquerelle and U. Hagen (1970)

Radiation sensitivity of bacteriophage DNA.

II. Breaks and cross-links after irradiation in vivo.

Int. J. Radiat. Biol. 17, 205

Bopp, A. und U. Hagen

End Group Determination in γ -Irradiated DNA.

Biochim. Biophys. Acta 209, 320

Brown, D.M. and A.R. Todd (1952)

Nucleotides, Part IX. The Synthesis of Adenylic Acids

a and b from 5'-Trityl Adenosine.

J. Chem. Soc. 44

Charlesby, A. (1960)

Atomic Radiation and Polymers.

Pergamon Press, Oxford

Coquerelle, Th., L. Bohne, U. Hagen und J. Merkwitz (1969)
Strahlenempfindlichkeit von Bakteriophagen-DNS.

I. Brüche und Vernetzungen nach Bestrahlung in vitro.

Z. Naturforschg. 24b, 885

Davison, P.F., D. Freifelder, and B.W. Holloway (1964)

Interruptions in the Polynucleotide Strands in
Bacteriophage DNA.

J. Mol. Biol. 8, 1-10

Dertinger, H. und H. Jung (1969)

Molekulare Strahlenbiologie.

Springer Verlag, Heidelberg

Eigner, J. and P. Doty (1965)

The Native Denatured and Renatured States of Deoxyribo-
nucleic Acid.

J. Mol. Biol. 12, 549

Elias, H.G. (1961)

Ultrazentrifugenmethoden.

Beckman Instruments, München 1961

Follett, E.A.C. und L.V. Crawford (1968)

Electron Microscope Study of the Denaturation of
Polyoma Virus DNA.

J. Mol. Biol. 34, 565

Freifelder, D. (1965)

Mechanism of Inactivation of Coliphage T7 by X-rays.

Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 54, 128

Hagen, U. und H. Wellstein (1965)

Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der DNS.
III. Brüche und Vernetzungen nach direkter Bestrahlung.
Strahlentherapie 128, 565

Hagen, U. (1967)

Bestimmung von Einzel- und Doppelbrüchen in bestrahlter
DNS durch die Molekulargewichtsverteilung.

Biochim. Biophys. Acta 134, 45

Hagen, U., M. Ullrich, E.E. Petersen, E. Werner, and
H. Kröger (1970)

Enzymatic RNA Synthesis on Irradiated DNA.

Biochim. Biophys. Acta 199, 115

Kay, E.R.M., N.S. Simmons, and A.L. Dounce (1952)

An Improved Preparation of Sodium-Deoxyribonucleate.

J. Amer. Chem. Soc. 74, 1724

Lowry, O.-H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, and

R.J. Randall (1951)

Protein Measurements with the Folin-Phenol Reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265

Lücke-Huhle, Ch., A. Braun, and U. Hagen (1970)

Oxygen Effect in γ -irradiated DNA.

Z. Naturforschg., im Druck.

Novogrodsky, A. und J. Hurwitz (1966)

The Enzymatic Phosphorylation of Ribonucleic Acid and
Deoxyribonucleic Acid.

I. Phosphorylation at 5'-Hydroxyl Termini.

J. Biol. Chem. 241, 2923

- Opschoor, A., P.H. Pouwels, C.M. Knijnenburg, and
J.B.T. Aten (1968)
Viscosity and Sedimentation of Circular Native Deoxy-
ribonucleic Acid.
J. Mol. Biol. 37, 13
- Ore, A. and A. Larsen (1964)
Relative Frequencies of Ion Clusters Containing various
Numbers of Ion Pairs.
Rad. Res. 21, 331
- Rauth, A.M. and J.A. Simpson (1964)
The Energy Loss of Electrons in Solids.
Radiat. Res. 22, 643
- Richardson, Ch. C. (1965)
Phosphorylation of Nucleic Acid by an Enzyme from T4
Bacteriophage - Infected Escherichia Coli.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 54, 158
- Sinsheimer, R.L. (1968)
Bacteriophage ϕ X 174 and Related Viruses.
Progr. Nucleic Acid Res. and Mol. Biol. 8, 115
- Taylor, W.D. and W. Ginoza (1967)
Correlation of γ -Ray Inactivation and Strand Scission
in the Replicative Form of ϕ X 174 Bacteriophage DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 58, 1753

Vinograd, J., J. Lebowitz, R. Radloff, R. Watson, and
P. Laipis (1965)

The Twisted Circular Form of Polyoma Viral DNA.

Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 53, 1105

Vinograd, J., J. Lebowitz, and R. Watson (1968)

Early and Late Helix-Coil Transitions in Closed Circular
DNA. The Number of Superhelical Turns in Polyoma DNA.

J. Mol. Biol. 33, 173

Weil, R. und J. Vinograd (1963)

Cyclic Helix and Cyclic Coils Forms of Polyoma DNA.

Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 50, 730

Weinert, H. (1967)

Über die Strahlenempfindlichkeit der Desoxyribonuclein-
säure im Nukleoprotein.

Dissertation, Freiburg

Westphal, H. (1970)

SV40-DNA Strand Selection by Escherichia coli RNA
Polymerase.

J. Mol. Biol. 50, 407

7. Tabellen und Abbildungen

Tabelle I: Anteil der Komponente I nach Bestrahlung trockener SV40-DNS im Vakuum vor und nach Alkali-Behandlung.

Versuchsserie	Sedimentation	Dosis [Krad]	Anteil der Komponente I	% Abnahme der Komponente I
I	neutral	0	0,58	100
		0	0,579	100
		50	0,48	87
		150	0,325	59
		200	0,27	49
		300	0,20	34,3
		400	0,14	25,4
		500	0,0	0
II	neutral	50	0,52	78,9
		100	0,48	73,9
		100	0,48	73,9
		150	0,42	63,7
		250	0,28	41,9
		300	0,22	33,4

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle I

III	neutral	0	0,48	100
		100	0,316	73,4
		150	0,275	63,8
IV	neutral	0	0,42	100
		50	0,38	88,3
		100	0,35	69,6
		150	0,265	61,5
		200	0,21	48,7
		250	0,21	48,7
		250	0,18	41,8
V	alkalisch (pH = 12,5)	50	0,15	85,5
		100	0,13	74,1
		150	0,113	64,4
VI	alkalisch (pH = 12,5)	0	0,248	100
		50	0,197	81,6
		100	0,185	76,5
		150	0,156	64,5
		200	0,1315	54,5

Tabelle II: Brüche und Endgruppen nach Bestrahlung trockener Thymus-DNS im Vakuum.

Dosis [Mrad]	S _{20,W}	M _w · 10 ⁻⁶	M _n · 10 ⁻⁶	B ₁ · 10 ⁴	5'OH-Gruppen pro Nukleotid · 10 ⁴	5'-Phosphatgruppen pro Nukleotid · 10 ⁴
0		7,44	2,66	0	0	0
5	8,8	1,23	0,235	14,5	0	1,33
10	7,55	0,65	0,15	23,2	0	1,95
10	7,9	0,7	0,335	8,15	0	0
20	7,0	0,51	0,26	10,6	0,5	2,36
20	5,7	0,275	0,185	13,5	0	8,9
30	5,65	0,37	0,07	52,0	0	-
30	5,4	0,28	0,125	24,3	-	6,7
40	5,2	0,275	0,084	40,2	0	2,6
40	4,75	0,22	0,092	34,2	0	20,0/16
40	4,7	0,155	0,0685	44,0	0	4,5
40	5,3	0,22	0,125	22,3	-	9,0
40	4,3	0,205	0,069	96,3	-	12,1
50	3,8	0,15	0,04	87,7	0	12,2
50	4,5	0,21	0,102	29,6	0,9	9,5/7,6/16,0
50	4,5	0,21	0,08	40,0	-	14
50	3,8	0,145	0,0415	48,3	-	17,7
60	4,1	0,29	0,165	16,9	-	17

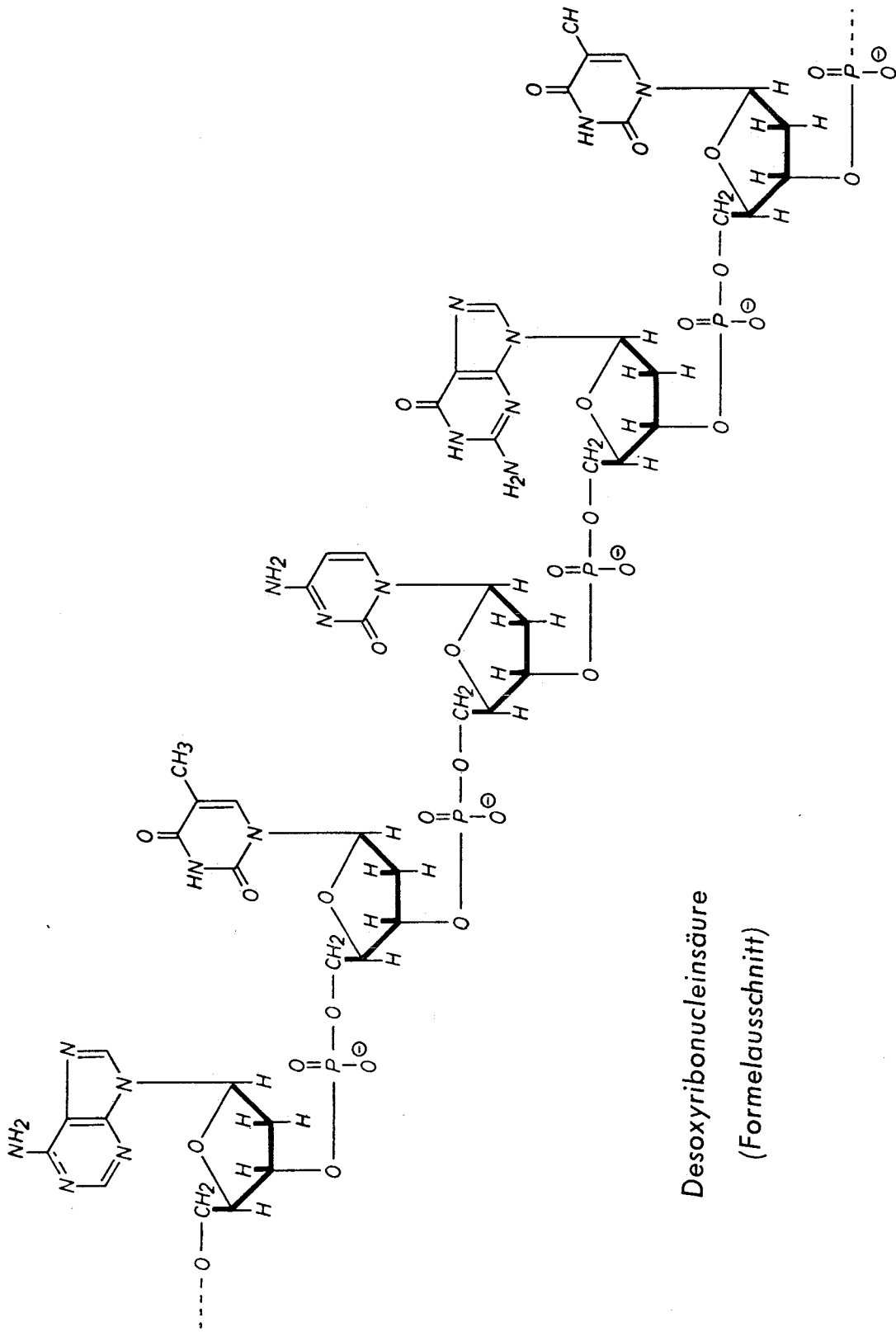
0 : Meßwert für die Radioaktivität des eingebauten ³²P nicht signifikant vom Nullwert verschieden

- : nicht gemessen

Tabelle III: Brüche und Endgruppen nach Bestrahlung von Thymus-DNS in Lösung.

Dosis [Krad]	$S_{20,W}$	$M_w \cdot 10^{-6}$	$M_n \cdot 10^{-6}$	$B_1 \cdot 10^4$	5'OH- + 5'-Phosphatgruppen pro 10^4 Nukleotide
0	12,5	-	-	-	0
30	3,1	0,0555	0,046	49,4	39
30	3,4	0,078	0,049	59,1	42,6
40	3,2	0,074	0,05	53,0	52
40	4,0	0,17	0,097	30,4	49,8
50	-	-	-	-	73
50	3,1	0,08	0,045	64,9	71

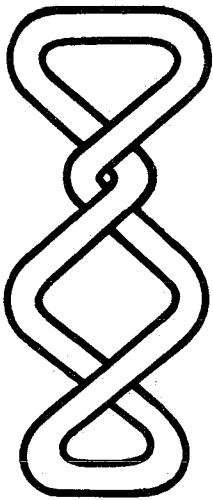
Abb. 1: Struktur der Desoxyribonukleinsäure (nach
Karlson, 1966).



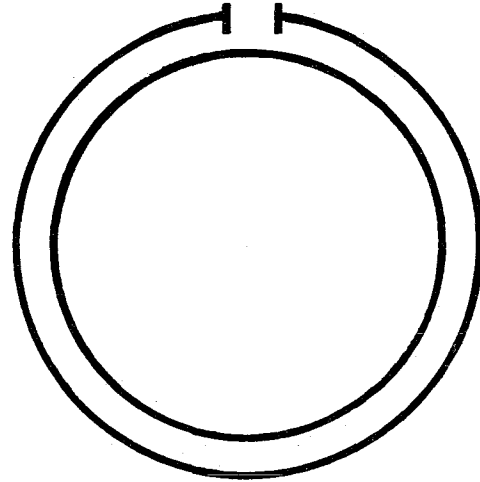
Desoxyribonucleinsäure
(Formelausschnitt)

Abb. 2: Schema der Struktur von SV40-DNS, Superhelix
(Komponente I) und offene Ringform mit einem
Einzelbruch pro Molekül (Komponente II).

SV 40 - DNS



*Superhelix
(Komponente I)
21 S*



*offene Ringform
(Komponente II)
16 S*

Abb. 3: Bandzentrifugation von SV40-DNS in neutraler Saccharose.

Probenkammer: 0,21 μ g DNS in 10 μ l 0,15 m NaCl
+ 0,015 m Na-Citrat.

Sektor: 4 % Saccharose, 0,05 m NaCl, 0,006 m
Phosphatpuffer, pH = 7,3.

Komponente I: $S_{20,W} = 21$

Komponente II: $S_{20,W} = 17$

Aufnahmen: 16, 32, 48, 64 Minuten nach Übersichtung.

Upm.: 17980

Bandzentrifugation von SV 40- DNS

neutral

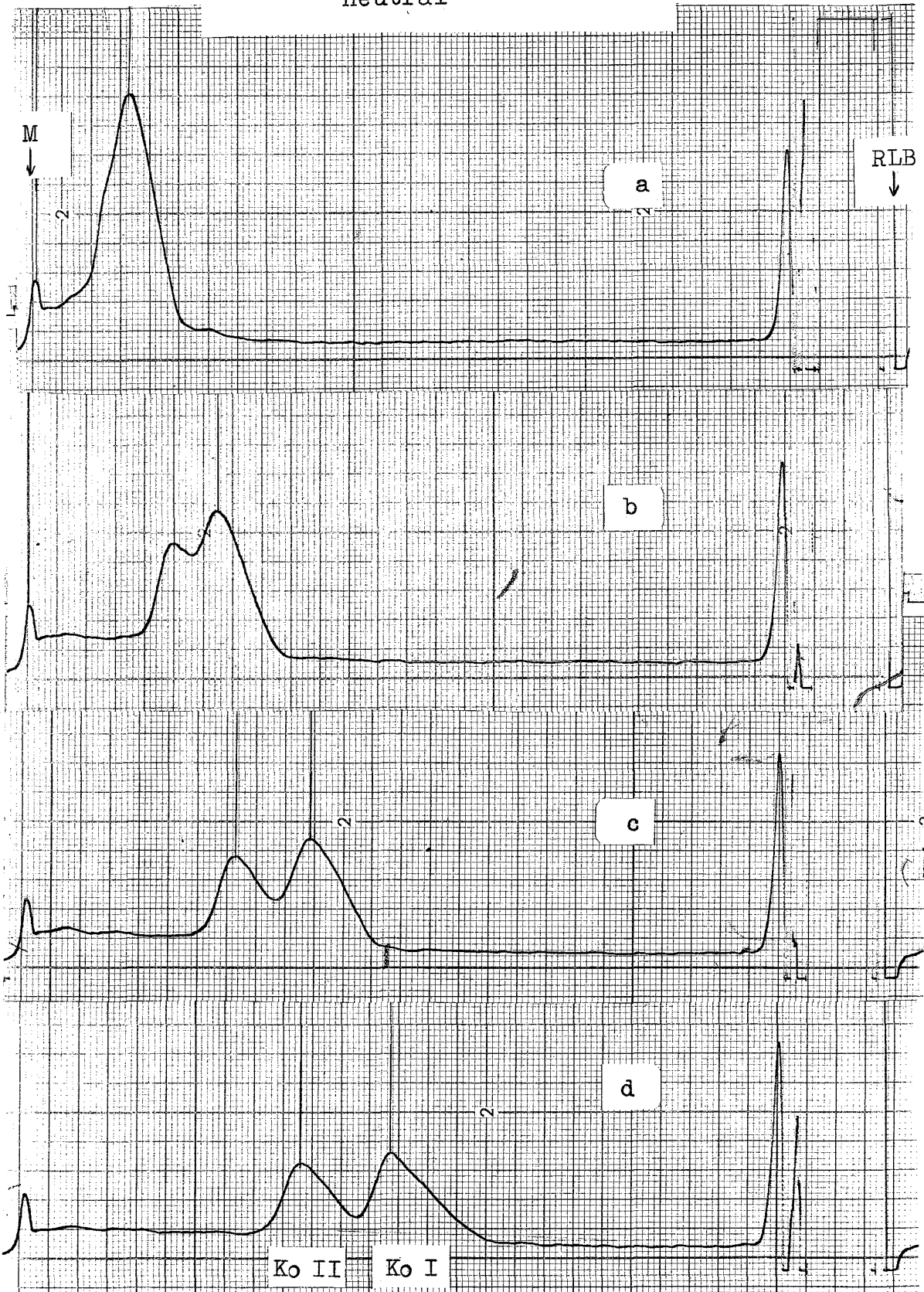


Abb. 4: Bandzentrifugation von SV40-DNS in alkalischer Saccharose.

Probenkammer: wie in Abb. 3

Sektor: 4 % Saccharose, 0,14 m NaOH, 0,02 m Na-Citrat (pH = 12,5).

Komponente I: $S_{20,w} = 21$

Einsträngige zirkuläre und lineare DNS:

$S_{20,w} = 15 - 17$

Aufnahmen: 16, 32, 48 Minuten nach Überschichtung.

Upm.: 17980

Bandzentrifugation von SV 40- DNS

alkalisch

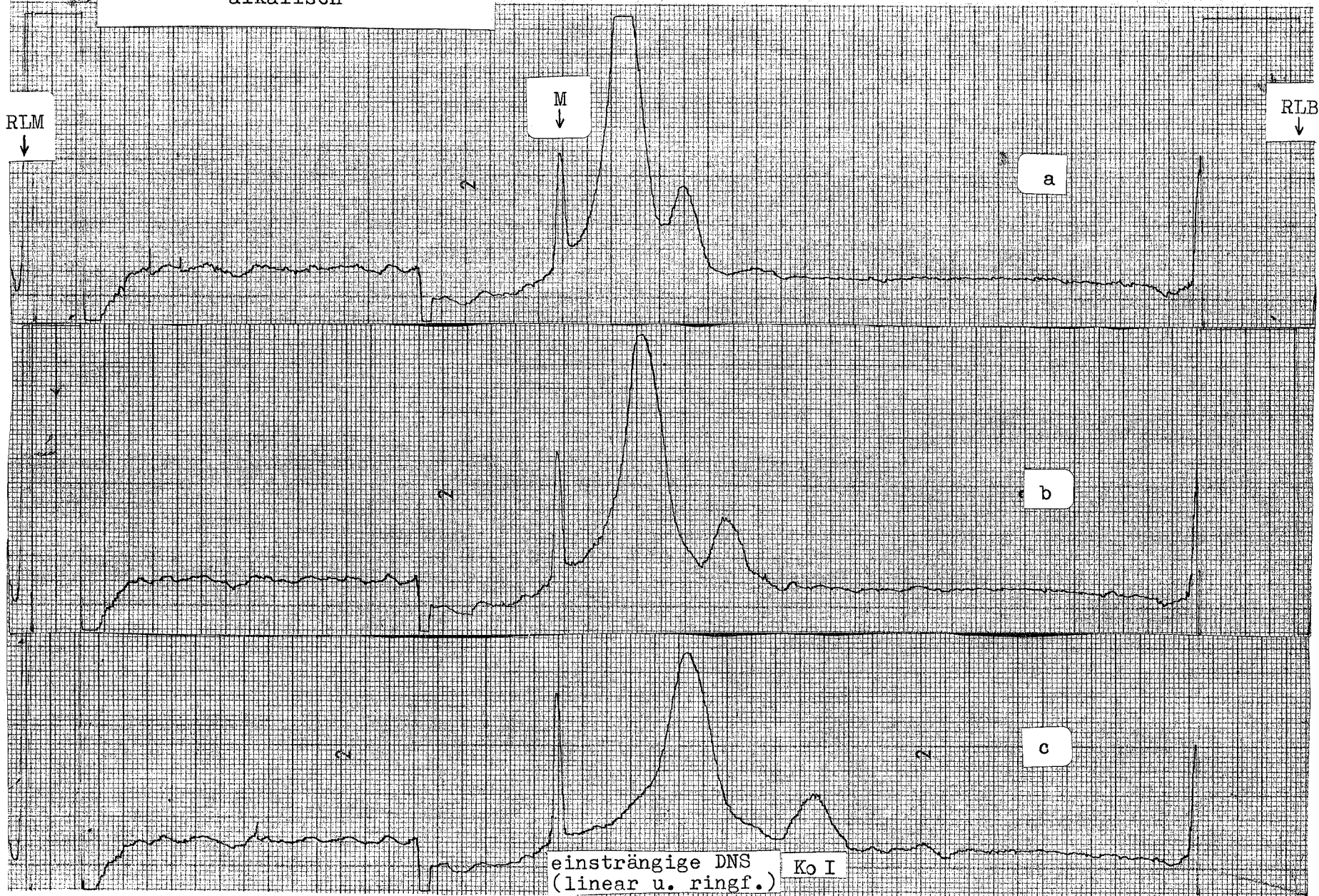


Abb. 5: Dosiseffektcurven der einzelnen Versuchsserien für die Abnahme der Komponente I nach Bestrahlung trockener SV40-DNS im Vakuum.

$\Delta, \circ, \square, \blacksquare$: Versuchsserien I - IV, Sedimentation in neutraler Saccharose.

\circ, Δ : Versuchsserien V + VI, Sedimentation in alkalischer Saccharose.

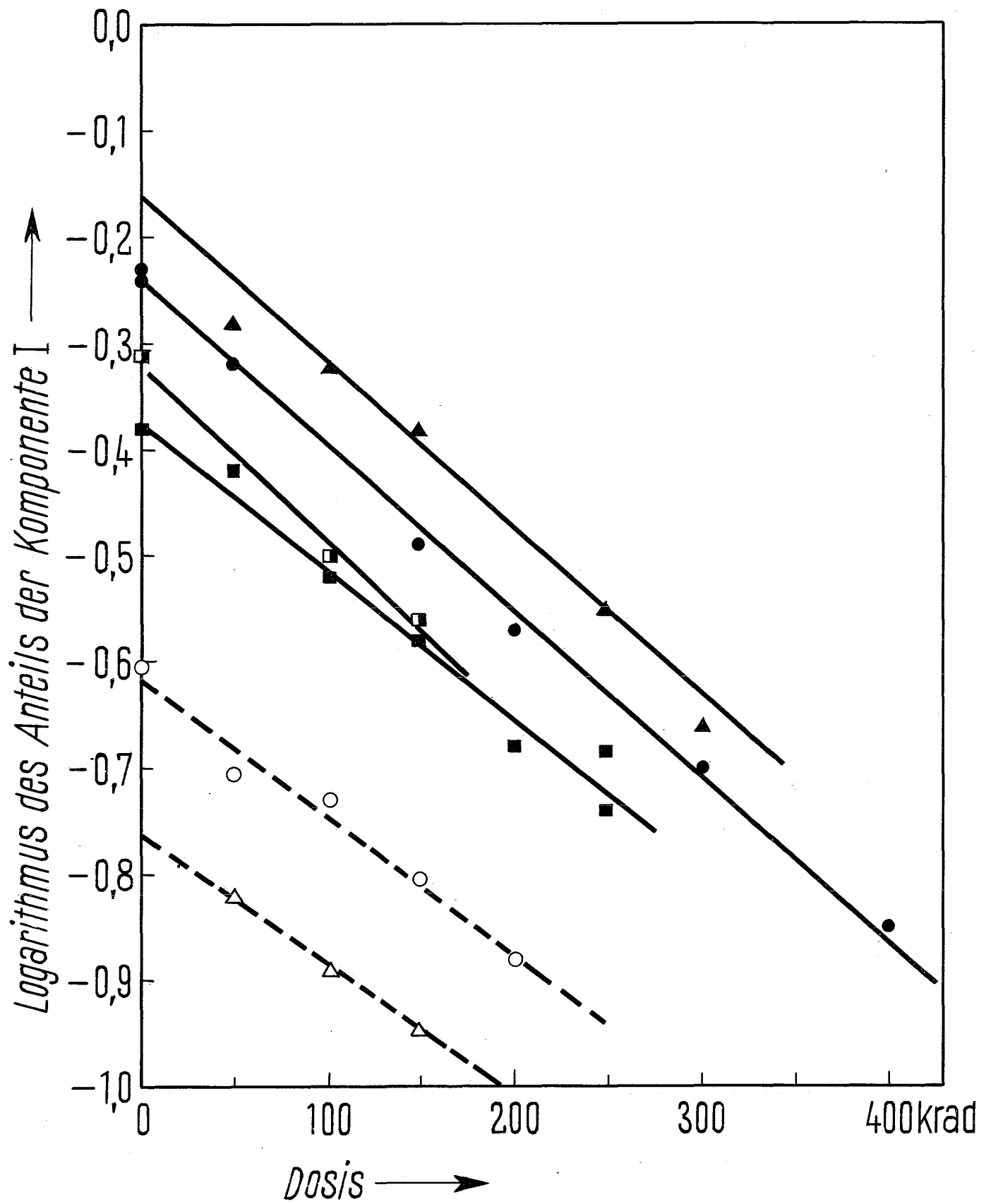


Abb. 6: Dosiseffektkurve der Abnahme der Komponente I nach Bestrahlung trockener SV40-DNS im Vakuum, normiert auf den Anteil der Komponente I ohne Bestrahlung (= 100 %).
Symbole wie in Abb. 5

Abb. 7: Dosiseffektkurve der Einzelstrangbrüche und der 5'-Endgruppen von Thymus-DNS, die im trockenen Zustand im Vakuum bestrahlt wurde.

⊗ Einzelstrangbrüche pro 10^4 Nukleotide

⊙ 5'-Phosphat-Endgruppen pro 10^4 Nukleotide

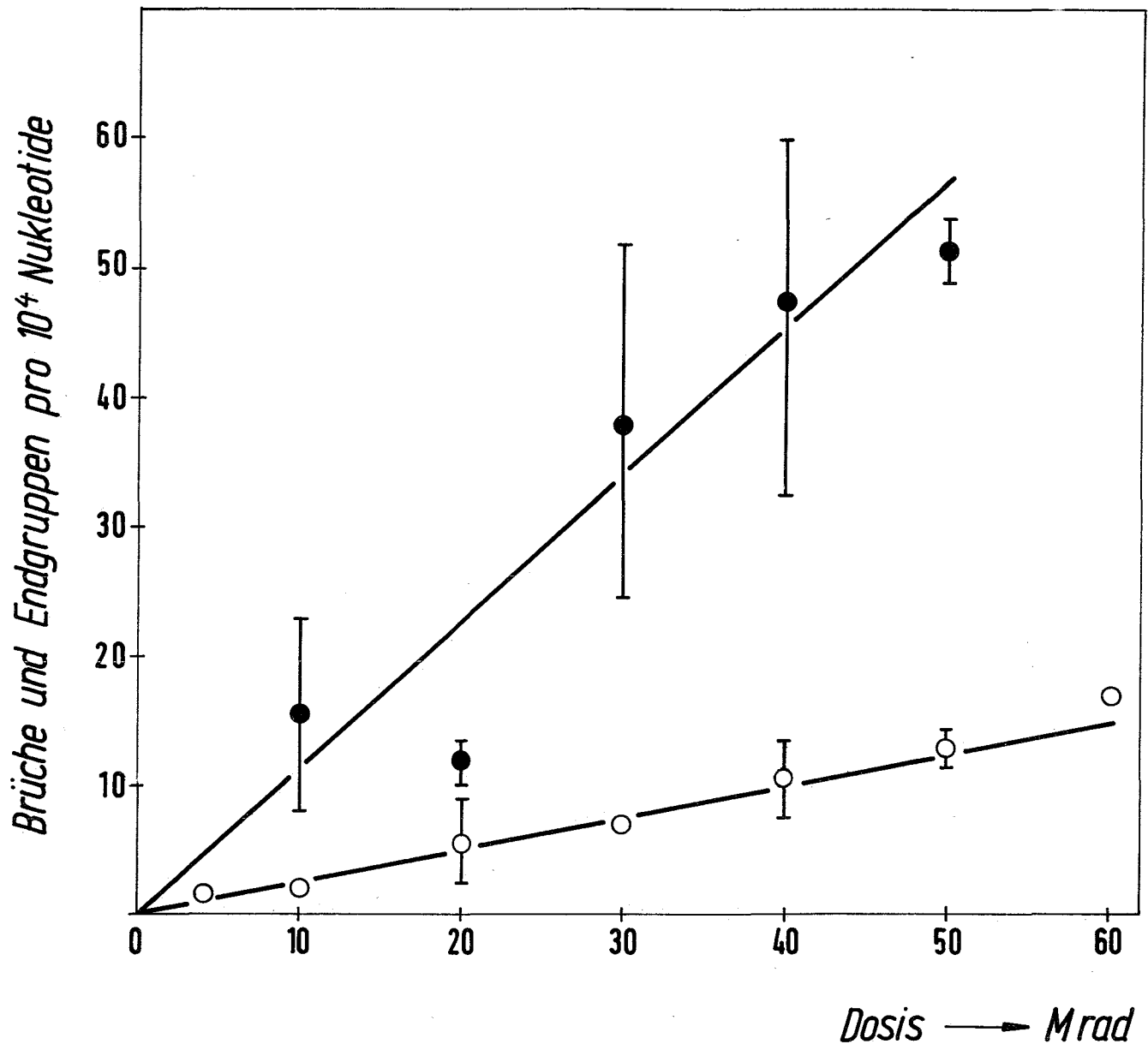


Abb. 8: Dosiseffektkurve der Einzelstrangbrüche und der 5'-Endgruppen von Thymus-DNS, die in 0,01 m NaCl bei 450 μ g/ml bestrahlt wurde.
Symbole wie in Abb. 7

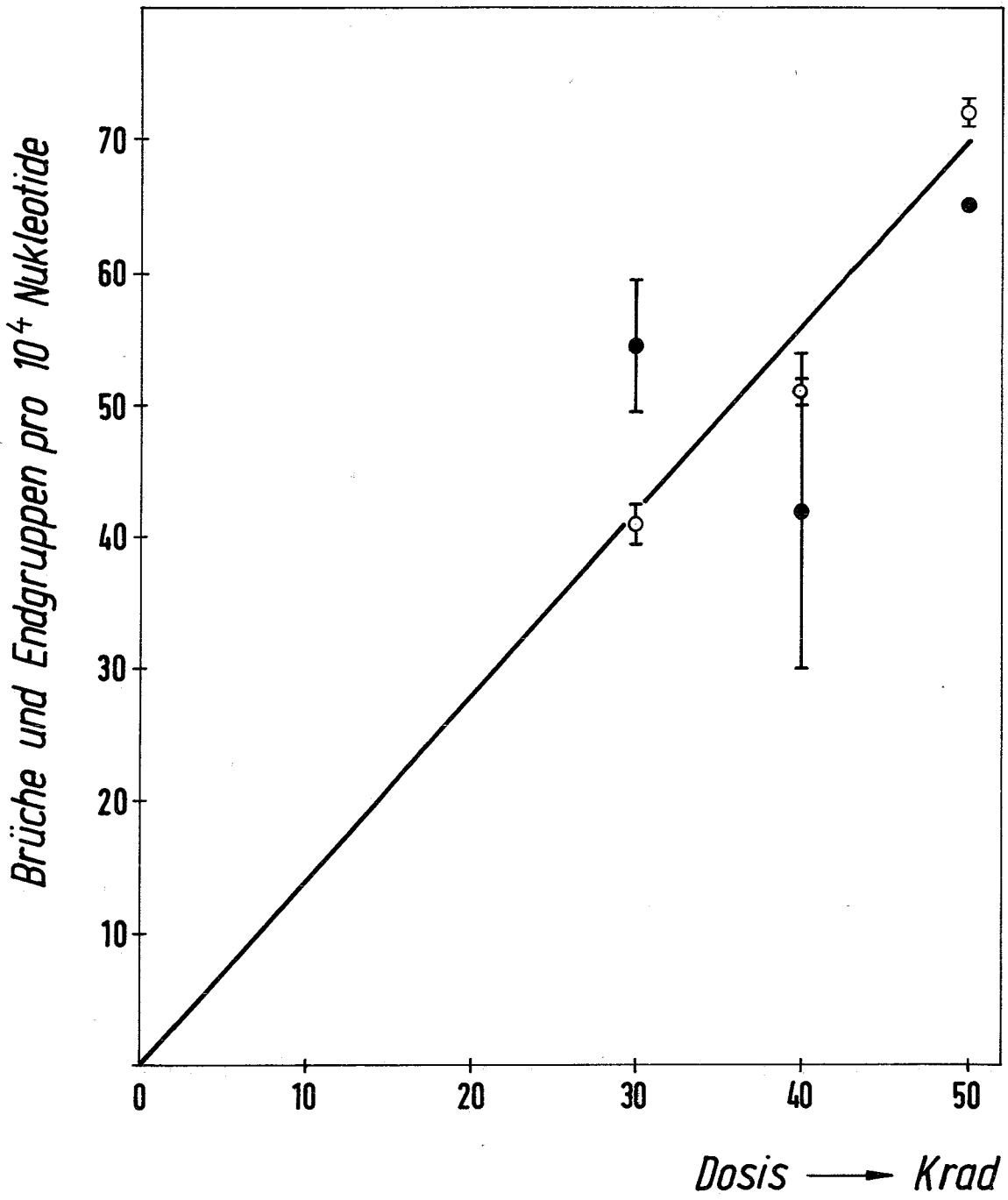


Abb. 9: Anteil der verschiedenen Ereignisse pro primäre Wechselwirkung der ionisierenden Strahlung mit der Materie

- a) Häufigkeit der Ereignisse in %
- b) Anteil der inelastisch gestreuten Elektronen pro Energieintervall (nach Rauth und Simpson 1964)
- c) Anteil der Primärionisationen mit verschiedenen Ionenpaaren (Ore und Larsen 1964)
- d) Anteil der Einzel- und Doppelstrangbrüche
- e) Anteil der charakterisierten 5'-Endgruppen

