

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM  
KARLSRUHE**

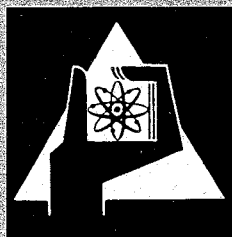
Januar 1967

KFK 596

Institut für Strahlenbiologie

Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der Desoxyribonukleinsäure  
IV. Strahlenschäden am DNS-Molekül in der bestrahlten Zelle

U. Hagen, K. Keck, F. Zimmermann, H. Kröger



**GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.  
KARLSRUHE**



Aus dem Radiologischen Institut der Universität Freiburg/Brsg.,  
dem Biochemischen Institut der Universität Freiburg/Brsg. und dem  
Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

## **Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der Desoxyribonukleinsäure**

### **IV. Strahlenschäden am DNS-Molekül in der bestrahlten Zelle**

Von

**Ulrich Hagen, Klaus Keck, Friedrich Zimmermann<sup>1</sup> und Hans Kröger**

Mit 2 Abbildungen

In vorausgehenden Mitteilungen [1–3] hatten wir einige Veränderungen der Molekülstruktur beschrieben, die an der Desoxyribonukleinsäure nach Bestrahlung *in vitro* eintreten. Insbesondere wurden die Öffnung der Wasserstoffbrücken, Brüche in der Einzel- oder Doppelkette sowie Vernetzungen in ihrer Abhängigkeit von der Strahlendosis dargestellt. An anderer Stelle [4, 5] wurde die Strahlenempfindlichkeit der DNS, als Matrize für die enzymatische RNS-Synthese zu dienen, beschrieben. Es bestand nun die Frage, ob diese Strahlenschäden auch dann auftreten, wenn die DNS in der lebenden Zelle bestrahlt wird. Dabei interessierten insbesondere die Veränderungen nach solchen Dosen, die zur Hemmung der Zellteilung, zu Chromosomenbrüchen oder zum Tod in der Interphase führen.

Unser Untersuchungsobjekt war der Thymus von Mäusen, die eine Ganzkörperbestrahlung erhalten hatten. Durch frühere Untersuchungen [6, 7] ist bekannt, daß die DNS im Thymus nach einer Ganzkörperbestrahlung zunehmend degradiert wird, was im Zusammenhang mit dem allmählich eintretenden Tod der Lymphozyten steht. Es interessierte, ob an dieser degradierten DNS irgendwelche, für einen Strahlenschaden typische Veränderungen zu beobachten sind.

Auf der anderen Seite sollte nach Reaktionen gesucht werden, die unmittelbar durch die Absorption der Strahlenenergie im DNS-Molekül eintreten. Es war hier zu berücksichtigen, daß die bei der Isolierung erhaltenen DNS-Moleküle mit einem Molekulargewicht von etwa  $10^7$  nur einen relativ kleinen Treffbereich besitzen. Nach den Untersuchungen von *Hutchinson* und *Arena* [8] sind in der Bakterienzelle neben den direkten Treffern in der DNS die in der Umgebung entstehenden diffundierenden Radikale wirksam. Dabei ergab sich ein Diffusionsradius von  $10 \text{ \AA}$ . Nimmt man entsprechende Verhältnisse in der Säugetierzelle an, so müssen DNS-Moleküle von einem Molekulargewicht von  $10^7$  mit etwa 20 kR bestrahlt werden, um im Mittel einen zur Gen-Inaktivierung

<sup>1</sup> Forstbotanisches Institut der Universität Freiburg.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. Langendorff zum 65. Geburtstag gewidmet.

wirksamen Treffer zu erhalten. Zur Klärung dieser Frage wurden gefrorenes Thymusgewebe oder Thymuszellen *in vitro* bestrahlt.

### *Methodik*

Es wurden Mäuse oder Ratten eines institutseigenen Inzuchtstammes (Radiologisches Institut) beiderlei Geschlechtes verwendet. Die Ganzkörperbestrahlung erfolgte mit 150-kV-Röntgenstrahlen, die Dosimetrie mit einem Simplex-Dosimeter der PTW, Freiburg. Einzelheiten sind an anderer Stelle beschrieben [6]. Zur Bestrahlung von Thymusgewebe *in vitro* wurden Thymi von Mäusen durch tiefgekühlte Metallplatten flach gepreßt, gefroren und auf einem mit festem CO<sub>2</sub> gekühlten Metallhalter mit 50-kV-Röntgenstrahlen bestrahlt (Siemens Dermopanröhre, 50 kV, 25 mA, 0,3 mm Al). Die Dosimetrie erfolgte mit Eisensulfat nach *Fricke* [9]. Zur Herstellung von Thymozyten wurde etwa 1 g Thymus mit Messern fein zerkleinert, in warmer Hanksscher Nährlösung suspendiert und durch Gaze filtriert. Die erhaltenen Zellsuspensionen bestehen zum größten Teil aus Thymozyten, sie werden im Stickstoff- oder Sauerstoffstrom bestrahlt. Unbestrahlte Zellen werden in ähnlicher Weise behandelt. Danach wurden die Zellen sofort abzentrifugiert und daraus die DNS isoliert.

#### *Isolierung der DNS*

Bei den meisten Isolierungsverfahren wird die DNS mehrmals zur besseren Reinigung umgefällt. Da jedoch die Gefahr bestand, daß die geschädigten und degradierten DNS-Moleküle bei der Fällung im Überstand verbleiben und verlorengehen, veränderten wir die von *Colter* und Mitarb. [10] beschriebene Isolierungsmethode derart, daß eine Fällung vermieden wurde. Nach der Behandlung mit Phenol und Äther wurde deshalb die DNS-haltige wäßrige Phase gegen 0,2 m NaCl dialysiert und dann mit 0,1 mg/ml RNSase (*Serva*, 5mal crist.) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion und Deproteinisierung mit Phenol erhält man DNS-Lösungen von etwa 300  $\gamma$ /ml. Im Trockenpräparat finden sich etwa 3 bis 5% RNS und 0,5 bis 1% Protein. Zur Basenanalyse wurde die DNS nach *Kay* und Mitarb. [11] mit Duponol isoliert.

#### *Eigenschaften der isolierten DNS*

Die Größe der erhaltenen DNS-Moleküle charakterisierten wir durch die Bestimmung der Sedimentationsverteilung. Dabei wurde einmal die Verteilung der nativen, doppelsträngigen DNS bestimmt sowie auch die der denaturierten, einsträngigen DNS. Auf diese Weise läßt sich, wie an anderer Stelle ausgeführt [2, 12, 13], die Zahl der vorhandenen Doppelbrüche und Einzelbrüche ermitteln.

Der Schmelzpunkt wurde, wie früher angegeben [1], durch stufenweises Erhitzen der DNS von 50° bis 90° C bestimmt; die Methode der Analyse der Basenzusammensetzung der einzelnen DNS-Proben ist an anderer Stelle beschrieben [14]. Die biologische Aktivität einer DNS-Probe ermittelten wir bei der RNS-Synthese mit RNS-Polymerase, die nur in Gegenwart von DNS abläuft. Isolierung des Enzyms und Inkubationsansatz sind bei [4] beschrieben.

### *Ergebnisse*

#### *Veränderungen nach Ganzkörperbestrahlung*

Unsere früheren Untersuchungen über den DNS-Gehalt des Thymus nach letaler Ganzkörperbestrahlung hatten bis zu 18 Stunden danach keine signifikanten Veränderungen gezeigt. Bestimmt man jedoch die Viskosität der extrahierten DNS, so findet man zwischen der 2. und 6. Stunde nach Bestrahlung eine allmähliche Abnahme bis auf die Hälfte. Wie vergleichende histologische Untersuchungen zeigten [6], steigt gleichzeitig die Zahl der toten Zellen mit pyknotischen Zellkernen bis auf 90% an.

Um nun die Degradierung der DNS in den strahlengeschädigten Zellen besser beschreiben zu können, isolierten wir 6 Stunden nach 600 oder 800 R die DNS

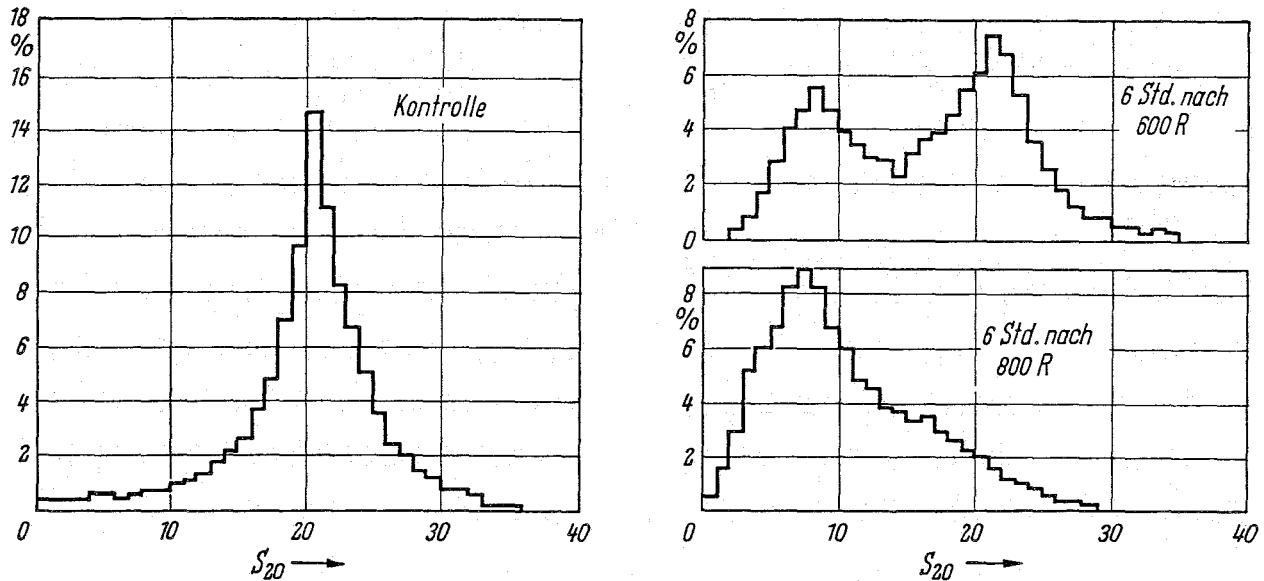


Abb. 1. Verteilung der Sedimentation der DNS, isoliert aus dem Thymus von bestrahlten Mäusen.

aus dem Thymus von Mäusen und bestimmten das Sedimentationsdiagramm (Abb. 1). Bei unbestrahlten Tieren findet sich eine relativ enge Verteilung der Molekülgrößen von 15 bis 25 S, die mittlere Sedimentationskonstante beträgt 21 S. Wie an anderer Stelle näher ausgeführt [13], beträgt das Gewichtsmittel des Molekulargewichtes  $M_w = 7,43 \pm 0,35 \times 10^6$ . Dabei wurden 8 verschiedene DNS-Proben ausgewertet. Untersucht man nun DNS aus bestrahlten Tieren, so findet man unmittelbar nach Bestrahlung zunächst keine signifikanten Veränderungen des Sedimentationsdiagramms, auch nicht, wenn die Tiere mit Dosen bis zu 3000 R bestrahlt wurden.

Eine deutliche Veränderung des Sedimentationsdiagramms zeigt sich aber, wenn die DNS 6 Stunden nach 600 oder 800 R isoliert wird. Nach 600 R findet man eine zweigipflige Kurve, es handelt sich also um ein pauci-polymolekulares Gemisch. Diese Verteilung bleibt auch dann erhalten, wenn man die DNS ausfällt und wieder auflöst. Das eine Maximum liegt bei 22 S, entspricht also der DNS aus normalen Zellen, das andere liegt etwa bei 8 S. Nach der von *Eigner* und *Doty* [15] angegebenen Beziehung zwischen  $S^0$  und  $M$  haben diese degradierten DNS-Moleküle etwa ein Molekulargewicht von  $2 \times 10^6$ . In drei weiteren Versuchen ergaben sich sehr ähnliche Verteilungen. Werden die Tiere mit 800 R bestrahlt, so sind 6 Stunden später die DNS-Moleküle mit S-Werten zwischen 15 und 30 fast verschwunden; das Maximum der Häufigkeit liegt bei 8 S.

Eine vergleichende histologische Untersuchung des Thymus 6 Stunden nach 600 bzw. 800 R ergab zu 50 bzw. 90% Zellkernpyknosen. Es ist möglich, daß nach 600 R die DNS-Moleküle zwischen 15 und 30 S von lebenden Zellen stammen und die zwischen 0 und 15 S vornehmlich aus toten Zellen.

*Berenbom* und *Peters* [16] berichteten, daß die DNS, die aus der Milz röntgenbestrahlter Ratten isoliert wurde, sich in ihrer Basenzusammensetzung von der Kontrolle stark unterscheidet, wobei eine Zunahme der Purine im Verhältnis zu den Pyrimidinen beobachtet wurde. Die Basenzusammensetzung der aus anderen Organen isolierten DNS war dagegen nicht verändert. *Palecek* [17] zeigte, daß dieser Effekt schon fünf Tage nach Bestrahlung mit 100 R erkennbar wird. Bei Bestrahlung mit 400 R wurde nach 24 Stunden eine DNS isoliert, deren Purin/Pyrimidin-Verhältnis 1,78 betrug.

Tabelle 1. Basenzusammensetzung hochmolekularer DNS aus Thymus und Milz ganzkörperbestrahlter Ratten. Angabe in %, Mittelwerte bei den Kontrollen aus 5 Bestimmungen  $\pm \sigma_M$ , bei den bestrahlten Proben aus 2 Bestimmungen.

Organ	Bestrahlungsbedingung	Adenin	Guanin	Cytosin	Thymin	Pu/Py*
Thymus	Kontrolle	27,5 $\pm$ 0,5	21,0 $\pm$ 0,3	20,5 $\pm$ 0,8	31,0 $\pm$ 0,6	0,94
	18 Std. nach 200 R	28,3	20,0	20,0	31,7	0,93
	10 Tage nach 200 R	28,0	20,9	20,9	30,2	0,96
Milz	Kontrolle	28,4 $\pm$ 0,6	21,6 $\pm$ 0,3	20,8 $\pm$ 0,6	29,2 $\pm$ 0,4	1,00
	24 Std. nach 200 R	27,5	20,3	20,8	31,4	0,92
	24 Std. nach 400 R	28,7	19,6	21,5	30,3	0,93

\* Pu/Py: Verhältnis zwischen Purinen und Pyrimidinen.

Wir haben Ratten bestrahlt und nach verschiedener Zeit DNS aus dem Thymus und der Milz isoliert. Die Basenzusammensetzung dieser DNS-Proben zeigt die Tabelle 1.

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Arbeiten ergab die Analyse keine signifikanten Änderungen in der Basenzusammensetzung. Unter den genannten Bedingungen wurden von *Palecek* besonders deutliche Veränderungen gefunden. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind vielleicht darauf zurückzuführen, daß die oben erwähnten Autoren die DNS unter stark sauren Bedingungen isoliert hatten. Dabei wird die DNS weitgehend denaturiert und degradiert. Eine Änderung im Purin/Pyrimidin-Verhältnis der hochmolekularen DNS ist schon deshalb nicht zu erwarten, weil die Helixstruktur der nach Bestrahlung isolierten DNS-Proben noch intakt ist, wie aus dem Verhalten in der Ultrazentrifuge und bei der Hitzedenaturierung hervorgeht.

Es wurde in diesem Zusammenhang auch das Sedimentationsdiagramm von DNS bestimmt, die 24 Stunden nach 200 R isoliert wurde. In drei Versuchen ergab sich keine signifikante Abweichung von der Sedimentationsverteilung von DNS aus unbestrahlten Tieren.

Der Schmelzpunkt der DNS, die aus dem Thymus bestrahlter Mäuse isoliert wurde, zeigt die Tabelle 2. Dabei wurden die verschiedensten Bestrahlungsbedingungen ausgewählt. Weder bei den hier nicht dargestellten Schmelzkurven, d. h. der Temperaturabhängigkeit der optischen Dichte, noch beim Schmelzpunkt ergab sich eine signifikante Abweichung von den Kontrollwerten.

Tabelle 2. Schmelzpunkt von DNS-Präparaten in 0,01 m NaCl, die aus dem Thymus bestrahlter Mäuse isoliert wurden (n = 5).

Bestrahlungsbedingung	$T_m \pm \sigma_m$
Kontrolle	74,8 $\pm$ 0,45
6 Stunden nach 200 R	74,6 $\pm$ 0,19
12 Stunden nach 200 R	74,3 $\pm$ 0,18
24 Stunden nach 200 R	75,0 $\pm$ 0,25
24 Stunden nach 400 R	74,9 $\pm$ 0,55
6 Stunden nach 800 R	73,9 $\pm$ 0,40
2 Stunden nach 4000 R	76,0 $\pm$ 0,13

Tabelle 3. Biologische Aktivität von DNS-Präparaten aus bestrahlten Tieren.

Angabe in  $m\mu\text{mol}$  AMP pro Enzymsatz inkorporiert. Messung der einzelnen Versuchsserien mit verschiedenen Enzympräparaten (Experiment I bis III). Inkubationsansatz von 0,25 ml mit 10  $\mu\text{mol}$  Trispuffer,  $p_{\text{H}}$  7,9; 0,25  $\mu\text{mol}$   $\text{MnCl}_2$ ; 1,0  $\mu\text{mol}$   $\text{MgCl}_2$ ; 0,10  $\mu\text{mol}$   $[8-^{14}\text{C}]\text{-ATP}$  ( $1,56 \cdot 10^5$  cpm/ $\mu\text{mol}$ , Schwarz-BioResearch Inc.); nicht markiertes CTP, GTP, UTP, je 0,10  $\mu\text{mol}$ ; 2,0  $\mu\text{mol}$   $\beta$ -Mercaptoäthanol; RNS-polymerase (0,11 mg Protein); 20  $\mu\text{g}$  DNS. Inkubation 20 min bei 37°.

Probe	$m\mu\text{mol}$ $[8-^{14}\text{C}]\text{-AMP}$ inkorporiert			% der Kontrolle
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	
Rattenthymus Kontrolle	3,74			
Rattenthymus Kontrolle	3,55			
6 Std. nach 800 R	3,78			103,5
Rattenthymus Kontrolle	8,49			
1 Std. nach 200 R	6,05			71,2
2 Std. nach 200 R	6,78			80,0
6 Std. nach 200 R	6,78			80,0
12 Std. nach 200 R	8,69			101,6
10 Tage nach 200 R	7,50			88,3
15 Tage nach 200 R	6,98			82,3
20 Tage nach 200 R	7,11			83,8
24 Tage nach 200 R	7,45			87,7
30 Tage nach 200 R	6,31			74,3
45 Tage nach 200 R	7,38			87,0
Mäusethymus Kontrolle	2,84	3,00	9,47	
sofort nach 200 R	2,02	3,18	7,85	85,6
sofort nach 400 R	2,63	2,38	6,22	78,1
sofort nach 800 R	2,11	2,07	7,51	72,9
sofort nach 1600 R	2,87	3,10	7,98	98,1
sofort nach 3200 R	(4,28)	2,89	7,13	83,7
Rattenthymus Kontrolle	4,85	7,76	3,84	
7 Tage nach 500 R	1,98	4,14	2,28	47,1
14 Tage nach 500 R	3,32	6,23	2,35	70,0
21 Tage nach 500 R	5,14	6,15	3,15	89,1
28 Tage nach 500 R	4,18	6,88	3,18	86,0
35 Tage nach 500 R	5,46	5,25	2,12	78,4
Rattenleber Kontrolle	3,68	5,25	3,08	
7 Tage nach 500 R	3,94	6,64	4,46	125,0
14 Tage nach 500 R	2,36	4,45	3,37	88,7
21 Tage nach 500 R	2,63	5,78	3,53	98,5
28 Tage nach 500 R	2,66	5,94	3,77	102,0
35 Tage nach 500 R	(1,60)	3,46	2,92	70,2

Wie aus der Bestrahlung von DNS in vitro bekannt [4], ist die Abnahme der biologischen Aktivität eines der empfindlichsten Kriterien der Strahlenschädigung der DNS. Am Sedimentationsdiagramm hatten wir die auffälligsten Veränderungen nach einer Ganzkörperbestrahlung gefunden, wenn 6 Stunden nach 800 R isoliert wurde. Wie Tabelle 3 zeigt, besitzt jedoch diese degradierte DNS die gleiche biologische Aktivität wie die der Kontrolle. Auch unter anderen Bestrahlungsbedingungen konnten keine signifikanten Änderungen der biologischen Aktivität gefunden werden, weder an der DNS aus Thymus noch an der aus der Leber. Zwar wird aus dem Thymus bestrahlter Tiere eine DNS mit etwas geringerer Aktivität isoliert, doch ist diese Abnahme auf etwa 80% unabhängig von der Zeit nach Bestrahlung und von der verabreichten Dosis. Es besteht somit kein unmittelbarer Zusammenhang mit der Strahleneinwirkung.

#### *Veränderungen an der DNS nach Bestrahlung isolierter Zellen oder Gewebe*

Um die direkte Wirkung der Strahlung auf die DNS in der Zelle zu prüfen, wurde Thymusgewebe bei  $-90^{\circ}$  oder Thymuszellen bei  $20^{\circ}$  C unter  $O_2$  oder  $N_2$  bestrahlt und unmittelbar anschließend daran die DNS isoliert. Wie oben erwähnt, war erst bei 20 kR zu erwarten, daß im Mittel jedes der DNS-Moleküle mit einem Molekulargewicht von  $10^7$  einmal getroffen wird. Ein solcher für die Gen-Inaktivierung wirksamer Treffer kann aber zu den verschiedensten Veränderungen führen. Beschränkt man sich auf die Bestimmung eines einzelnen Ereignisses, wie z. B. den leicht nachzuweisenden Doppelbruch, so kann dieses erst nach viel höheren Dosen beobachtet werden. Wir haben deshalb im folgenden die Zellen oder gefrorenes Thymusgewebe mit 100 bis 400 krad bestrahlt und zur Charakterisierung der Molekülgröße die Sedimentationsverteilung der isolierten DNS bestimmt. Beispiele solcher Verteilungen gibt die Abbildung 2. In der an anderer Stelle beschriebenen Weise [13] wurde aus diesen Sedimentationsverteilungen das mittlere Molekulargewicht berechnet, und zwar einmal das Gewichtsmittel  $M_w$  und zum anderen das Zahlenmittel  $M_n$ . Degradierete Proben zeichnen sich dadurch aus, daß das Zahlenmittel stärker erniedrigt ist als das Gewichtsmittel. Die entsprechenden Werte aus bestrahlten Zellen oder Geweben sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

In Abbildung 2 ist zu erkennen, daß auch aus den unbestrahlten Zellen DNS-Proben mit niedermolekularen Bruchstücken isoliert werden. Offenbar ist eine gewisse Schädigung der Zellen bei der Präparation nicht zu vermeiden. Die Heterogenität der DNS wird aber wesentlich größer, wenn man aus bestrahlten Zellen DNS isoliert. Die Zahl der kleinen Moleküle steigt mit der Dosis an; bei Bestrahlung unter Sauerstoff wird ein größerer Effekt erzielt als unter Stickstoff. Diesen Abbau der DNS kann man auch erkennen, wenn man die mittleren Molekulargewichte berücksichtigt. Es findet sich sowohl beim Gewichtsmittel als auch beim Zahlenmittel eine dosisabhängige Abnahme. Ähnliche Veränderungen finden sich an den DNS-Präparaten, die aus bestrahltem Gewebe stammen.

Brüche in der Einzelkette können erkannt werden, wenn man die DNS-Ketten durch Denaturierung trennt und die Größe der Einzelkette bestimmt. Früher hatten wir gesehen [2, 13], daß nach Bestrahlung von DNS-Lösungen zunächst Brüche in der Einzelkette eintreten, bevor an der Doppelkette eine Degradierung zu bemerken ist. Denaturiert man die DNS aus bestrahlten Zellen, so findet



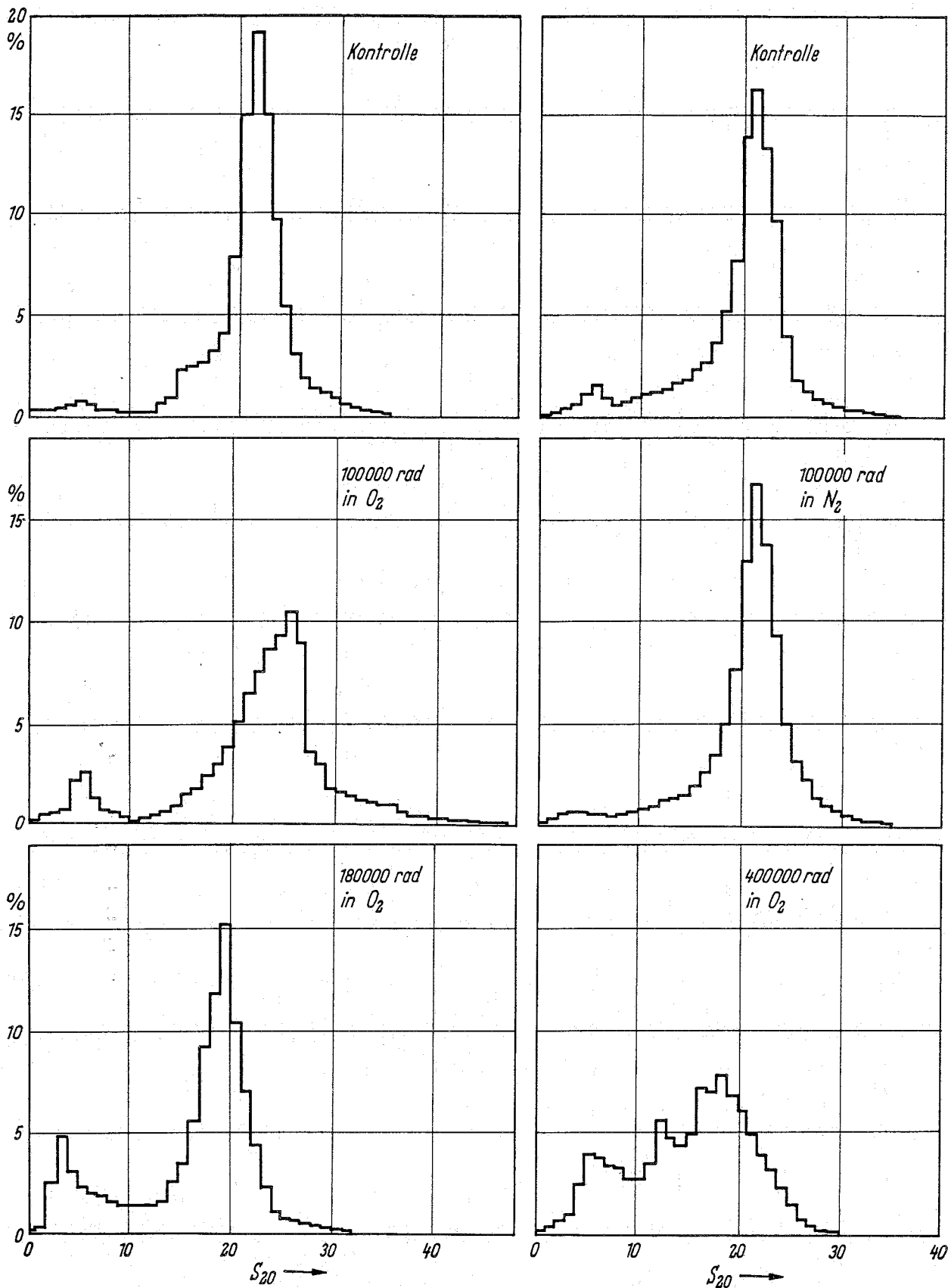


Abb. 2. Verteilung der Sedimentation nativer DNS, extrahiert aus bestrahlten Thymuszellen.

Tabelle 4. Molekulargewichte von DNS-Proben aus bestrahlten Zellen (Thymus und Gewebe).

Dosis	Bestrahlungsbedingungen	Zustand	$M_w \cdot 10^{-6}$	$M_n \cdot 10^{-6}$
Kontrolle	Zellen	nativ	7,82	1,12
Kontrolle	Zellen	nativ	10,50	1,01
Kontrolle	Zellen	nativ	9,28	0,77
Kontrolle	Zellen	nativ	8,49	2,02
100 000 rd	Zellen 20° in N <sub>2</sub>	nativ	9,82	0,47
100 000 rd	Zellen 20° in O <sub>2</sub>	nativ	8,0	0,403
180 000 rd	Zellen 20° in O <sub>2</sub>	nativ	6,24	0,203
400 000 rd	Zellen 20° in O <sub>2</sub>	nativ	5,28	0,327
Kontrolle	Gewebe - 90°	nativ	9,03	1,67
100 000 rd	Gewebe - 90° 0,3 mm Al.	nativ	8,35	0,40
200 000 rd	Gewebe - 90° 0,3 mm Al.	nativ	7,25	0,54
400 000 rd	Gewebe - 90° 0,3 mm Al.	nativ	6,70	0,290
Kontrolle	Zellen	denaturiert	3,73	0,315
Kontrolle	Zellen	denaturiert	0,406	0,165
180 000 rd	Zellen 20° in O <sub>2</sub>	denaturiert	0,489	0,156
400 000 rd	Zellen 20° in O <sub>2</sub>	denaturiert	2,01	0,129
Kontrolle	Gewebe - 90°	denaturiert	1,026	0,340
180 000 rd	Gewebe - 90°	denaturiert	0,456	0,134
200 000 rd	Gewebe - 90°	denaturiert	0,638	0,200
200 000 rd	Gewebe - 90°	denaturiert	0,889	0,263

sich ebenfalls eine Degradierung (Tab. 4), die allerdings nicht stärker ist als die der Doppelkette. Das deutet auf einen anderen Mechanismus der Degradierung hin.

Einige DNS-Proben aus bestrahlten Zellen wurden ferner auf ihre biologische Aktivität bei der enzymatischen RNS-Synthese geprüft. Es fand sich kein Unterschied zu der Aktivität von DNS aus unbestrahlten Zellen; allerdings war auch bei den Kontrollen die Aktivität viel niedriger als bei DNS-Präparaten, die aus frischem, gefrorenen Thymus isoliert wurden.

#### *Diskussion*

Es wurde mit verschiedenen Methoden versucht, eine Schädigung der DNS-Struktur nach einer Bestrahlung in der lebenden Zelle nachzuweisen. Durch die Bestimmung der Sedimentation erhält man Hinweise auf die Länge der Nukleotidkette; Schmelzpunktbestimmungen charakterisieren den Zustand der Wasserstoffbrücken, und die Aktivität der DNS bei der enzymatischen RNS-Synthese kann als Maß ihrer biologischen Funktion gelten.

Zunächst interessierten die Strahlenschäden, die an der DNS unmittelbar nach Bestrahlung zu beobachten sind. Eine Ganzkörperbestrahlung bis zu 4000 R brachte keine Veränderungen der DNS-Struktur, weder in der Kettenlänge, dem System der Wasserstoffbrücken noch in der biologischen Aktivität. Höhere Dosen konnten nur isolierten Zellen oder Geweben verabreicht werden.

Mit 100 kRad und darüber konnten Brüche in der DNS-Kette nachgewiesen werden, und zwar abhängig von der Strahlendosis sowie der Anwesenheit von Sauerstoff während der Bestrahlung.

Die Zahl der Brüche läßt sich aus den mitgeteilten Molekulargewichten ermitteln. Nach 100 kRad findet sich etwa ein Bruch in einem Molekül. Allerdings hat es den Anschein, daß einzelne Moleküle stark degradiert werden und andere gar nicht. Eine genaue Analyse des Abbaues aus dem Gewichts- und Zahlenmittel in der an anderer Stelle angegebenen Weise [13] ist deshalb nicht möglich. Bei der Bestrahlung von DNS in Lösung oder in trockener Form beobachteten wir dagegen eine viel gleichmäßigere Degradierung der einzelnen Moleküle [3, 13].

Ein Unterschied zu der Strahlenwirkung *in vitro* ergibt sich auch, wenn man die Größe der denaturierten DNS-Moleküle, also der Einzelketten, betrachtet. Der hier erkennbare Abbau der DNS-Kette, d. h. die Zahl der Einzelbrüche, ist nicht größer als die der Doppelbrüche; nach Bestrahlung *in vitro* finden sich dagegen viel mehr Einzelbrüche als Doppelbrüche [2, 3, 13].

Die Brüche in der DNS bestrahlter Zellen sind somit vorzugsweise Doppelbrüche, sie sind ferner ungleichmäßig im DNS-Molekül verteilt. Diese heterogene Verteilung der Brüche hängt möglicherweise mit der besonderen Anordnung der DNS-Moleküle im Chromosom des ruhenden Kerns zusammen. Ebenso könnte auch die Häufung von Doppelbrüchen gegenüber Einzelbrüchen damit erklärt werden. Allerdings fehlen noch hierfür gesicherte Vorstellungen über die räumliche Anordnung der Moleküle im Ruhekern.

Auf der anderen Seite kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Degradierung der DNS in der bestrahlten Zelle durch eine Freisetzung der DNSase II aus dem Zytoplasma und aus den Lysosomen bedingt ist, welche nach den verabreichten hohen Dosen schon während der Bestrahlung einsetzt. Nach den Untersuchungen von *Bernardi* [18] ist zudem bekannt, daß diese DNSase vorzugsweise Doppelbrüche hervorruft, im Gegensatz zur DNSase I, die nur einen Strang der DNS-Helix spaltet.

Die Veränderungen an der DNS-Struktur, die erst einige Stunden oder Tage nach Ganzkörperbestrahlung eintreten, müssen dagegen in anderer Weise gedeutet werden. Die deutlichste Degradierung der DNS-Kette fand sich zu einem Zeitpunkt, an dem die meisten lymphatischen Zellen des Thymus eine Pyknose des Zellkerns zeigten, also abgestorben waren. DNS-Präparate aus solchen Zellen zeigten im Mittel ein Molekulargewicht von  $2 \times 10^6$ ; es ist wahrscheinlich, daß während des Zelltodes eine Degradierung durch die freiwerdende DNSase stattfindet. Eine entsprechende Aktivierung der DNSase läßt sich auch im Thymus zu diesem Zeitpunkt nachweisen [19]. Diese degradierten DNS-Moleküle haben auch noch die gleiche biologische Aktivität. Wie aus vorläufigen Versuchen bekannt ist, kann man ein DNS-Präparat *in vitro* mit DNSase bis zu einem Molekulargewicht von  $10^6$  abbauen, ohne daß die biologische Aktivität wesentlich abnimmt.

Zu einem späteren Zeitpunkt nach Bestrahlung, wenn die toten Zellen verschwunden sind, ist kein Unterschied zu der DNS von Kontrolltieren nachzuweisen, weder an der Kettenlänge, den Wasserstoffbrücken noch der biologischen Aktivität. Frühere Berichte anderer Autoren über eine Veränderung der Basenzusammensetzung konnten nicht bestätigt werden.

### *Zusammenfassung*

Mit verschiedenen Methoden wurden DNS-Präparate untersucht, die aus dem Thymus bestrahlter Mäuse oder Ratten isoliert wurden oder die aus bestrahltem Thymusgewebe oder Thymuszellen stammen. Das Molekulargewicht der DNS-Proben, bestimmt durch die Verteilung der Sedimentation, Schmelzpunkt der DNS und Basenzusammensetzung, dienten als Kriterien, um mögliche Strahlenschäden an der DNS-Struktur zu erkennen. Zudem wurde die biologische Aktivität der DNS-Proben bestimmt, indem sie als Starter für die enzymatische RNS-Synthese eingesetzt wurden.

Strahlenbedingte Veränderungen konnten nur an der Sedimentation gesehen werden; Schmelzpunkt, Basenzusammensetzung und biologische Aktivität blieben unter allen untersuchten Bestrahlungsbedingungen unverändert. Unmittelbar nach einer Ganzkörperbestrahlung bis zu 4000 R fanden sich keinerlei Veränderungen im Sedimentationsdiagramm; bestrahlt man Zellen oder Gewebe mit 100 bis 400 kRad, so können dosisabhängige Brüche in der Nukleotidkette nachgewiesen werden. Diese Brüche sind vorzugsweise Doppelbrüche. Isoliert man die DNS erst einige Stunden nach einer letalen Ganzkörperbestrahlung, so finden sich degradierte DNS-Moleküle. Diese stammen aus abgestorbenen Zellen mit pyknotischem Kern.

### *Summary*

Various methods were employed to investigate DNA-preparations isolated from the thymus of irradiated mice or rats as well as from irradiated thymus-tissue and from thymocytes. The molecular weight determined by sedimentation analysis, the melting point and the base composition of the DNA served as criteria for radiation damage. Further more, the biological activity of the DNA was examined by their priming ability for enzymatic RNA-synthesis.

Radiation induced changes could be seen only by sedimentation analysis. Melting point, base composition and biological activity did not show any response to radiation. Immediately after whole body irradiation with doses up to 4000 R no changes were observed in the sedimentation distribution. Samples of DNA, isolated from tissues or cells after irradiation with 100 to 400 kRad however show dose dependend breaks in the nucleotide chain. These breaks were mostly double breaks. When the DNA was isolated a few hours after lethal whole body irradiation degraded DNA-molecules were found. These derive from dead cells with a pycnotic nucleus.

### *Résumé*

Différentes méthodes ont été utilisées pour examiner des préparations d'ADN de thymus de rats ou de souris, isolé à partir de cellules ou de tissus irradiés ou encore d'animaux irradiés in toto. Le poids moléculaire de l'ADN estimé par la distribution de la sédimentation, le point de fusion et la composition en bases ont servi de critères pour reconnaître les radiolésions possibles dans la structure de l'ADN. En outre, on a testé l'activité biologique de l'ADN en le considérant comme la matrice pour la synthèse enzymatique de l'ARN.

Seule la sédimentation a pu montrer des modifications induites par l'irradiation, le point de fusion, la composition en bases et l'activité biologique restant inchangés dans les conditions d'irradiation étudiées. Immédiatement après une irradiation de tout de corps allant jusqu' à 4000 R, aucune modification du diagramme de sédimentation n'a pu être mise en évidence; mais l'irradiation de cellules ou de tissus avec des doses allant de 100 à 400 kRad montre des ruptures dans la chaîne nucléotidique. Ces ruptures sont essentiellement des doubles cassures. Si au contraire, l'ADN est isolé quelques heures après une irradiation létale de tout le corps, on trouve alors des molécules d'ADN dégradées et celles-ci proviennent de cellules mortes montrant des noyaux pyknotiques.

### Schrifttum

1. Hagen, U., R. Wild: Strahlentherapie 124 (1964), 275. — 2. Hagen, U.: Strahlentherapie 124 (1964), 428. — 3. Hagen, U., H. Wellstein: Strahlentherapie 128 (1965), 565. — 4. Zimmermann, F., H. Kröger, U. Hagen, K. Keck: Biochim. biophys. Acta (Amst.) 87 (1964), 160. — 5. Hagen, U., K. Keck, H. Kröger, F. Zimmermann, Th. Lücking: Biochim. biophys. Acta (Amst.) 95 (1965), 418. — 6. Hagen, U., H. Braun: Strahlentherapie 116 (1961), 374. — 7. Hagen, U.: Strahlentherapie 116 (1961), 385. — 8. Hutchinson, F., J. Arena: Radiat. Res. 13 (1960), 137. — 9. Fricke, H., St. Morse: Strahlentherapie 26 (1927), 757. — 10. Colter, J. S., R. A. Brown, K. A. O. Ellem: Biochim. biophys. Acta (Amst.) 55 (1962), 31. — 11. Kay, E. R. M., N. S. Simmons, A. L. Dounce: J. Amer. chem. Soc. 74 (1952), 1724. — 12. Hagen, U.: Nature 197 (1963), 1004. — 13. Ders.: Biochim. biophys. Acta (Amst.) (im Druck). — 14. Keck, K., U. Hagen: Biochim. biophys. Acta (Amst.) 87 (1964), 685. — 15. Eigner, J., P. Doty: J. molec. Biol. 12 (1965), 549. — 16. Berenbom, M., E. R. Peters: Radiat. Res. 5 (1956), 515. — 17. Palecek, E.: Folia biol. 5 (1959), 432. — 18. Bernardi, G., M. Champagne, Ch. Sadron: Nature 188 (1960), 228. — 19. Philipp, U.: Diss. Freiburg/Brsg. 1961.

*Anschriften d. Verff.:* Privatdozent Dr. Dr. U. Hagen, Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum, 75 Karlsruhe, Postfach 947; Dipl.-Chem. K. Keck, Radiologisches Institut der Universität, 78 Freiburg/Brsg., Albertstr. 23; Dr. F. Zimmermann, Forstbotanisches Institut der Universität, 78 Freiburg/Brsg., Bertoldstr. 7, und Dozent Dr. Dr. H. Kröger, Biochemisches Institut der Universität, 78 Freiburg/Brsg., Hermann-Herder-Str. 7.