

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM**

**KARLSRUHE**

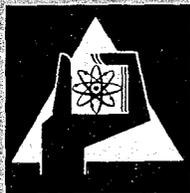
August 1968

KFK 849

Institut für Strahlenbiologie

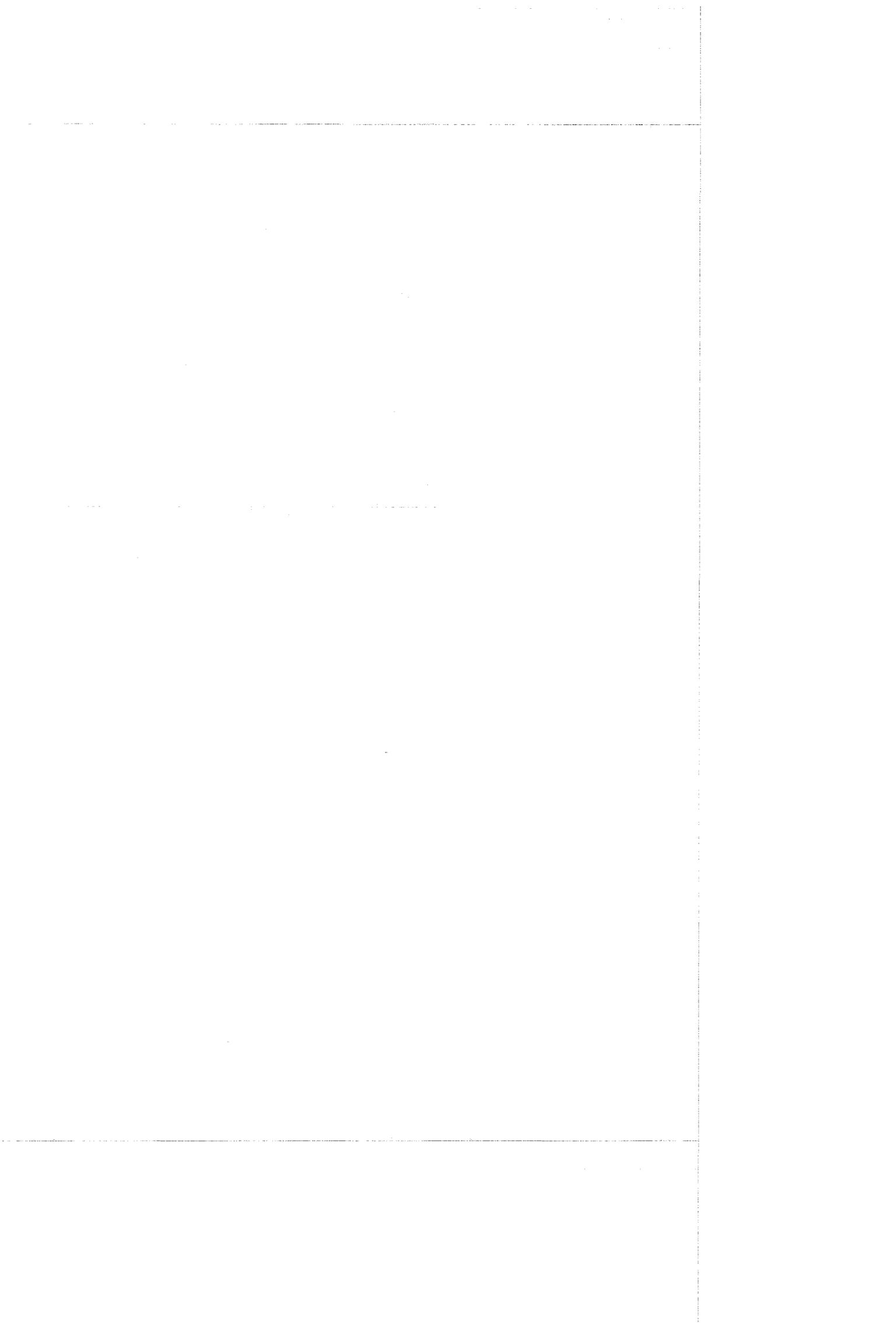
Über die Strahlenempfindlichkeit der Desoxyribonukleinsäure  
im Chromatin

H. Weinert, U. Hagen



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

**KARLSRUHE**



Sonderdruck

**136/2**

1968

# **Strahlentherapie**

**Archiv für klinische  
und experimentelle Radiologie**

## **Über die Strahlenempfindlichkeit der Desoxyribonukleinsäure im Chromatin**

Heide Weinert, Ulrich Hagen

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe



**URBAN & SCHWARZENBERG**  
MÜNCHEN-BERLIN-WIEN

Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten

© Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1968



In vorausgehenden Mitteilungen [1–4] hatten wir Veränderungen der Desoxyribonukleinsäure-Struktur beschrieben, die nach Bestrahlung *in vitro* eintreten. Als Kriterien für den Strahlenschaden der DNS wurden Brüche in der Einzelkette und in der Doppelhelix sowie das Auftreten von Vernetzungen herangezogen. Weiter wurde die Stabilität der Wasserstoffbrücken untersucht. Je nach den Bestrahlungsbedingungen ändert sich das Verhältnis von Einzel- zu Doppelbrüchen. In verdünnten wäßrigen DNS-Lösungen entstehen Doppelbrüche nur dann, wenn zwei Einzelbrüche zufällig gegenüberliegen. Entsprechend nimmt die Zahl der Doppelbrüche quadratisch mit der Dosis zu. Bei Bestrahlung trockener DNS findet sich dagegen ein lineares Ansteigen der Doppelbrüche. Offenbar kann bereits eine Primärisation zum Bruch beider Ketten führen. Vernetzungen scheinen bei höheren DNS-Konzentrationen häufiger einzutreten als in verdünnten Lösungen [3, 4].

Es besteht nun die Frage, in welchem Verhältnis diese Strahlenschäden zueinander stehen, wenn die DNS in der lebenden Zelle bestrahlt wird. Bei der Bestrahlung von Bakteriophagen wurde ein konstantes Verhältnis von einem Doppelbruch zu 10 Einzelbrüchen gefunden [5]. Zusätzlich finden sich Hinweise dafür, daß auch Vernetzungen innerhalb eines einzelnen Phagengenoms eintreten [6]. In bestrahlten Bakterien konnte bisher nur mit Sicherheit die Zahl der Einzelbrüche gemessen und mit der Inaktivierungsrate verglichen werden [7]. Bei der Bestrahlung von Thymuszellen oder von Thymusgewebe bei tiefen Temperaturen wurde gefunden [8], daß Brüche in der DNS vorzugsweise Doppelbrüche sind.

Diese Untersuchungen an Thymuszellen zeigten jedoch auch, daß bei der Bestrahlung

---

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden von H. Weinert als Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg/Brsg. vorgelegt.

lebender Zellen sekundäre Veränderungen an der DNS durch enzymatische Reaktionen nicht sicher ausgeschlossen werden können. Wir untersuchten deshalb die Strahlenempfindlichkeit der DNS in definierten Nukleoproteingelen, in denen diese sekundären Vorgänge nicht berücksichtigt werden müssen. Dabei sollte der physikalische Zustand dieser Gele möglichst den Verhältnissen entsprechen, die im Interphasechromosom der lebenden Zelle vorliegen.

Im Chromatin der Säugetierzellen sind die DNS-Moleküle mit basischen sowie mit sauren Proteinen verbunden. Röntgenfeinstrukturanalysen an isoliertem Nukleoprotein [9] machen wahrscheinlich, daß die DNS-Fäden einzeln von den basischen Proteinen umhüllt sind. Andere Autoren [10] vermuten, daß *in vivo* jeweils mehrere DNS-Moleküle zusammengelagert und von einem gemeinsamen Histonmantel umgeben sind. Die sauren Proteine sind wahrscheinlich Strukturproteine des Chromosoms [11]. Durch die Analysen von *Luzzati* und *Nicolaieff* [12] ist bekannt, daß die Anordnung der DNS im Nukleoprotein je nach dem Wassergehalt verschieden ist. Bei einer Nukleoproteinkonzentration von 0,005 bis 0,20 im Nukleoproteingel liegen mehrere, meist 4 DNS-Moleküle zusammen (isotrope Phase). Paarweise liegen die DNS-Moleküle dagegen bei einer Konzentration von 0,30 bis 0,50 ( $\omega$ -Phase). Bei höheren Konzentrationen ist dagegen jedes DNS-Molekül von einem Histonmantel umgeben ( $\psi$ -Phase).

Für unsere Bestrahlungsversuche wählten wir Nukleoprotein aus Kalbsthymus, das bei verschiedenem Feuchtigkeitsgehalt bestrahlt wurde. Einmal bestrahlten wir in der  $\psi$ -Phase mit einer Konzentration von 0,53. In dieser Phase sind die DNS-Moleküle ähnlich wie in der Zelle angeordnet. Ferner bestrahlten wir bei einer Konzentration von 0,20, um zu sehen, in welcher Weise die beobachtete Zusammenlagerung der DNS-Fäden die Strahlenreaktion beeinflusst.

## Strahlenempfindlichkeit der DNS im Chromatin

Die Wirkung ionisierender Strahlen auf Nukleoproteinlösungen ist verschiedentlich untersucht worden [13, 14, 15]. Es zeigte sich, daß nach kleinen Dosen die Histonmoleküle zunächst von der DNS abdissoziieren, wobei die DNS nur gering geschädigt wird. Erst höhere Dosen führen zu einem raschen Abbau der DNS. Wie Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der Wasserstoffbrücken ergaben [16], schützt der Proteinmantel die DNS etwa um einen Faktor von 10.

Diese Untersuchungen geben jedoch noch keinen Hinweis, ob nach Bestrahlung eines Nukleoproteins andersartige Reaktionen an der DNS eintreten als nach Bestrahlung reiner DNS. Wir untersuchten deshalb einige charakteristische Veränderungen der DNS aus bestrahltem Nukleoprotein, wie die Entstehung von Brüchen und von Vernetzungen. Weiter sollten Schmelzpunktbestimmungen über die Stabilität der Wasserstoffbrücken in der DNS Auskunft geben.

### Material und Methoden

#### Nukleoprotein

Aus Kalbsthymus wurde Nukleoprotein nach dem Verfahren von *Luzzati* und *Nicolaieff* [12] isoliert. Die in 0,14 m NaCl ausgefällten Nukleoprotein-fäden wurden mit Aceton und Äther getrocknet. Ebenso verwendeten wir Nukleoprotein von *Worthington B. C.* („Nucleohiston“), das in 0,14 m NaCl umgefällt wurde. Die Zusammensetzung dieser Nukleoproteinpräparate wurde hinsichtlich ihres Gehaltes an DNS, Histon, saurem Protein und RNS untersucht (Tab. 1). Die Bestimmung der DNS erfolgte nach *Burton* [17], die der RNS nach *Vokim* u. a. [18]. Die Histone wurden durch 3malige Extraktion in 0,1 m HCl vom sauren Protein abgetrennt. Ihre Konzentration ergibt sich aus einer Proteinbestimmung nach *Lowry* [19]. Um das Nukleoprotein als Gel zu erhalten, wird es mehrere Tage unter  $N_2$  in einer feuchten Kammer gehalten. In ihr befindet sich eine 9,33%ige  $CaCl_2$ -Lösung. Durch diese Behandlung nehmen im Mittel 20 mg Trockenpräparat  $11,7 \pm 0,23$  mg  $H_2O$  auf. Unter Berücksichtigung des Wasser- und Salzanteiles des Trockenpräparates (s. Tab. 1) ergibt sich daraus eine Nukleoproteinkonzentration von  $c = 0,532 \pm 0,0094$ . Für eine Konzentration von  $c = 0,20$  wurden zu 20 mg Trockenpräparat 0,06 ml  $H_2O$  gegeben und diese Mischung einige Tage unter  $N_2$  aufbewahrt. Damit wird eine gleichmäßige Durchfeuchtung des Nukleoproteingeles erreicht. Die Konzentration der DNS in den erhaltenen Nukleoproteingelen beträgt 0,242 und 0,093.

Tabelle 1. Zusammensetzung des mit Aceton und Äther getrockneten Nukleoproteins.

	Umgefällt aus Nukleoprotein von Worthington	Isoliert aus Kalbsthymus
DNS	39,20%	35,40%
Histon	32,80%	35,00%
Saures Protein	12,10%	12,08%
RNS	0,06%	2,14%
Wasser, Salz	15,84%	15,38%

#### Bestrahlung

Die Nukleoproteingele werden in einer Cobalt- $\gamma$ -Quelle (Gammacell 220, Atomic Energy of Canada, Ltd.) unter  $N_2$  bestrahlt.

#### Isolierung der DNS

Das früher beschriebene Verfahren der DNS-Isolierung aus dem Thymus mit Phenol [4] bewährte sich für das Nukleoprotein nicht; die DNS gelangt nur zu einem kleinen Teil in Lösung. Es ist möglich, daß bei der Isolierung des Nukleoproteins die DNS an das saure Protein fester gebunden wird. Mit Hilfe von proteolytischen Enzymen kann das Protein aber leicht entfernt werden [20]. Am geeignetsten erwies sich eine Inkubation des Nukleoproteins in 0,01% Trypsinlösung bei pH 7,8 (0,08 m Trispuffer) für 16 Std. bei 20 °C. Anschließend wird die DNS mit Phenol isoliert. Der Proteingehalt der DNS beträgt dann noch etwa 3%.

#### Bestimmung des Molekulargewichtes nativer und denaturierter DNS

Für die Ermittlung der Zahl der Brüche in der Doppelhelix sowie in der Einzelkette benötigt man, wie früher ausgeführt [4], das Zahlenmittel  $M_n$  des Molekulargewichtes der nativen bzw. der denaturierten DNS-Probe.  $M_n$  kann jedoch nicht durch eine unmittelbare Messung erhalten werden, vielmehr muß die Molekulargewichtsverteilung der DNS bestimmt und aus ihr das Gewichtsmittel  $M_w$  sowie  $M_n$  berechnet werden.

Folgendes Verfahren wurde angewendet: Bei jeder zu untersuchenden Probe wird vor und nach einer Denaturierung die Viskosität  $[\eta]$  bestimmt sowie die mittlere Sedimentationskonstante  $S_{app}$ , die sich für eine Konzentration von 20  $\mu g/ml$  ergibt. Weiter wird der in der analytischen Ultrazentrifuge erhaltene Gradient in eine integrale Verteilung der Sedimentation ( $S_{app}$ ) gegen die Gesamtmasse der Moleküle ( $c_i$ ) umgeformt. Einzelheiten hierzu sind früher beschrieben [3, 4]. Diese Sedimentationsverteilung gilt jedoch nur für die jeweilig verwendete Konzentration der DNS. Um die Ver-

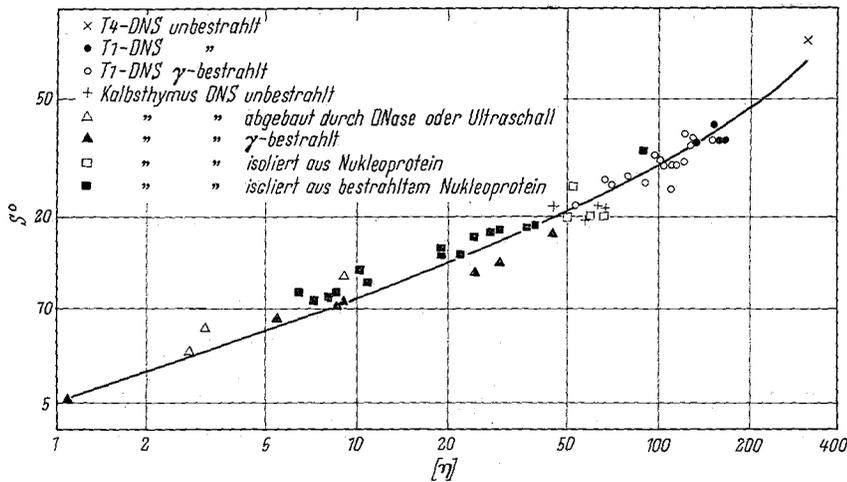


Abb. 1. Beziehung zwischen  $S^{\circ}$  und  $[\eta]$  bei nativer DNS, untersucht im Institut für Strahlenbiologie. Eingezeichnet ist die Mittelwertkurve von Eigner und Doty [24].

teilung der Sedimentation bei der Konzentration Null ( $S_i$ ) zu erhalten, wird für jedes  $S_{app}$  das entsprechende  $S_i^{\circ}$  nach der Gleichung (1) berechnet:

$$S_i^{\circ} = S_{app} \left( 1 + K_s [\eta]_i \left[ 0,5 + \frac{c_i}{2} \right] \right), \quad (1)$$

wobei  $K_s$ : ein von Eigner u. a. [23] definierter Wert für die Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentation ist ( $= 0,80$ ),  $K_z$ : die Ausgangskonzentration der DNS-Lösung in g/100 ml und  $c_i$ : die relative Konzentration am Gradienten.  $[\eta]_i$  ergibt sich aus der Beziehung zwischen  $S^{\circ}$  und  $[\eta]$ , die innerhalb eines weiten Bereiches des Molekulargewichtes von Eigner und Doty [24] an Hand von Literaturdaten verschiedener DNS-Präparationen erhalten wurde.

Es war nun aber zu prüfen, ob diese Beziehung auch für die DNS gilt, die aus dem bestrahlten Nukleoprotein isoliert wurde. Insbesondere könnten strahlenbedingte Vernetzungen Abweichungen bedingen. In Abbildung 1 wurde die von Eigner und Doty [24] angenommene Mittelwertkurve der Beziehung  $S^{\circ}/[\eta]$  aufgetragen sowie  $S^{\circ}$  und  $[\eta]$  von DNS-Präparaten, die in letzter Zeit im Institut für Strahlenbiologie [eigene Messungen, 21, 22] untersucht wurden.

Für die DNS-Präparate aus bestrahltem Nukleoprotein ergab sich eine geringe Abweichung nach oben; d. h., es wurden bei der entsprechenden Viskosität etwas zu hohe Sedimentationswerte gemessen. Die Abweichung liegt jedoch innerhalb des von anderen Autoren [24] gemessenen Streubereichs, so daß für die weiteren Berechnungen die von Eigner und Doty [24] angegebene Kurve verwendet werden konnte. Legt man diese Kurve etwas höher, damit sie sich noch genauer an unsere Mes-

sungen anpaßt, so wird, wie Versuchsrechnungen zeigten, die Extrapolation von  $S_{app}$  zu  $S$  nur geringfügig beeinflusst.

Diese Beziehung gilt für native DNS in einer Ionenkonzentration von 0,1 – 1,0 m  $Na^+$ , ist also relativ unempfindlich auf Veränderungen des Ionenmilieus. Bei denaturierter DNS ist die Beziehung  $S^{\circ}/[\eta]$  von der jeweiligen Denaturierungsart abhängig [4]. Es wurden deshalb die von uns untersuchten denaturierten DNS-Proben zur Aufstellung der  $S^{\circ}/[\eta]$ -Beziehung verwendet (Abb. 2). Mit dieser Beziehung läßt sich die Extrapolation von  $S_{app}$  zu  $S$  auch für denaturierte DNS nach Gleichung (1) durchführen.

Die erhaltene Sedimentationsverteilung  $S_i$  gegen  $c_i$  wird dann in eine Molekulargewichtsverteilung  $M_i$  gegen  $c_i$  umgewandelt nach der Gleichung

$$S^{\circ} = K_s \cdot M^{a_s}, \quad (2)$$

wobei für native DNS  $K_s = 0,063$ ,  $a_s = 0,37$  und für denaturierte DNS  $K_s = 0,055$  und  $a_s = 0,38$  steht. Diese Konstanten wurden aus den vergleichenden Viskositätsbestimmungen nach dem von

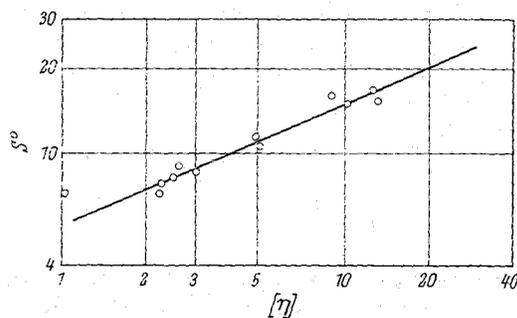


Abb. 2. Beziehung zwischen  $S^{\circ}$  und  $[\eta]$  bei denaturierter DNS aus bestrahltem und unbestrahltem Nukleoprotein.

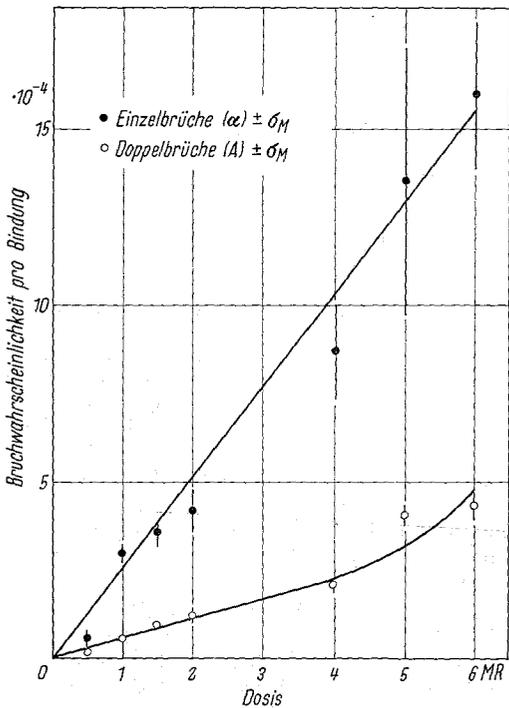


Abb. 3. Bruchwahrscheinlichkeit der DNS nach Bestrahlung im Nukleoproteingel bei der Konzentration  $c = 0,53$ .

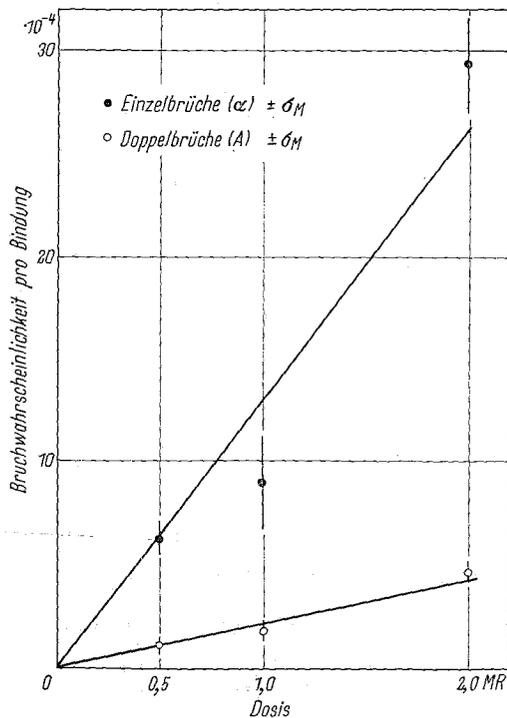


Abb. 4. Bruchwahrscheinlichkeit der DNS nach Bestrahlung im Nukleoproteingel bei der Konzentration  $c = 0,20$ .

Eigner und Doty [24] angegebenen Verfahren ermittelt. Aus der Molekulargewichtsverteilung kann das Gewichts- und Zahlenmittel des Molekulargewichtes ( $M_w$  und  $M_n$ ) nach einer beliebigen Klasseneinteilung bestimmt werden. Einzelheiten des ganzen Rechengangs sind bei Coquerelle u. a. [21] beschrieben.

#### Bestimmung der Bruchwahrscheinlichkeit

Aus dem Zahlenmittel des Molekulargewichtes der unbestrahlten Probe ( $M_{n_0}$ ) und dem der bestrahlten ( $M_n$ ) ergibt sich die Zahl der Brüche pro Molekül:  $B = (M_{n_0}/M_n) - 1$ . Bei nativer DNS beziehen wir die Zahl der Brüche auf die Zahl der Nukleotidpaare im unbestrahlten Molekül, bei denaturierter auf die der Nukleotide. Daraus ergibt sich

$A =$  Bruchwahrscheinlichkeit der Doppelhelix pro Nukleotidpaar und  
 $\alpha =$  Bruchwahrscheinlichkeit der Einzelkette pro Nukleotid.

#### Bestimmung des Schmelzpunktes der DNS-Lösung

Die Temperaturabhängigkeit der optischen Dichte der DNS wurde in einer kontinuierlich heizbaren Quarzküvette im Spektralphotometer bestimmt. Die

Lösung ( $80 \mu\text{g DNS/ml } 0,2 \text{ m NaCl}$ ) wird bis auf etwa  $95^\circ\text{C}$  erhitzt und die Extinktion bei  $260 \text{ nm}$  bei der jeweiligen Temperatur gemessen.

#### Ergebnisse

Nach Bestrahlung der Nukleoproteingele nimmt das Molekulargewicht der isolierten DNS stetig ab.  $M_w$  und  $M_n$  der nativen und der denaturierten DNS sowie die daraus errechneten Bruchwahrscheinlichkeiten  $A$  und  $\alpha$  finden sich in Tabelle 2 sowie den Abbildungen 3 und 4. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 4 Messungen mit ihrem Fehler  $\sigma_M$ .

Unter beiden Bestrahlungsbedingungen, bei der Nukleoprotein-Konzentration  $c = 0,53$  sowie  $0,20$  steigt die Bruchwahrscheinlichkeit für Einzel- sowie Doppelbrüche linear mit der Dosis an. Das deutet darauf hin, daß die Doppelbrüche durch ein einzelnes Absorptionsereignis im Nukleoproteingel entstehen. Das Verhältnis der Bruchwahrscheinlichkeit der Einzelkette zu dem des Doppelstranges beträgt  $1:4,45$  ( $c = 0,53$ ) und  $1:6,19$  ( $c = 0,20$ ). Bezogen auf die Masse der DNS sind also Einzelbrüche etwa 10mal häufiger als Doppelbrüche.

Dies entspricht etwa dem in Bakteriophagen gefundenen Verhältnis [5]).

Doppelbrüche können nicht nur durch eine Primärionisation entstehen, sondern auch dann, wenn zwei Einzelbrüche genau gegenüberliegen oder durch einige Nukleotidpaare voneinander getrennt sind. Wie früher gezeigt wurde [4], beträgt die Wahrscheinlichkeit für solche Doppelbrüche  $A' = 7 \cdot \alpha^2$ . Bei unseren Daten kann  $A'$  jedoch vernachlässigt werden; sie beträgt bei  $c = 0,53$  nach 6 MR nur  $0,1785 \cdot 10^{-4}$  gegenüber dem beobachteten Wert für  $A = 4,412 \cdot 10^{-4}$ . Es ist möglich, daß die Abweichung vom linearen Anstieg der Doppelbrüche über 5 MR durch diese zusätzlichen Doppelbrüche bedingt ist. Bei einer Nukleoproteinkonzentration von 0,20 ist nach 2 MR  $A' = 0,6 \cdot 10^{-4}$  gegenüber  $A = 4,67 \cdot 10^{-4}$ .

Nach den Untersuchungen von *Luzzati* und *Nicolaieff* [12] liegen die DNS-Moleküle im Nukleoproteingel je nach seiner Konzentration getrennt oder in Bündeln vor. Da bei der Bestrahlung isolierter DNS Vernetzungen der DNS-Moleküle beobachtet wurden [3, 4, 25], war zu prüfen, ob diese auch im Nukleoproteingel auftreten. Ein Kriterium für das Vor-

liegen von Vernetzungen gibt einmal das Verhältnis  $M_w/M_n$ . Wie von *Schulz* [26] gezeigt wurde, nähert sich  $M_w/M_n$  bei einem statistischen Abbau dem Wert 2, auch wenn die Ausgangssubstanz ein polymolekulares Gemisch darstellt. Liegen Vernetzungen vor, so steigt dieses Verhältnis über 2, wie sich an bestrahlten DNS-Lösungen zeigen ließ [4]. Bei der DNS aus bestrahltem Nukleoprotein ist  $M_w/M_n$  jedoch niemals größer als 2 (Tabelle 2).

Genauere Berechnungen über die Zahl der Vernetzungen sind nach dem Verfahren von *Charlesby* [27] möglich, wenn man die Neigung  $b$  der Regressionsgeraden aus der Beziehung zwischen reziprokem Molekulargewicht ( $M_w$  und  $M_n$ ) und der Dosis bestimmt. Wir bezeichnen sie mit  $b_w$  und  $b_n$ . Das Verhältnis der Bruchwahrscheinlichkeit  $p_0$  zu der Wahrscheinlichkeit  $q_0$  eines Monomers, an einer Vernetzungsreaktion beteiligt zu sein, ist

$$\frac{p_0}{q_0} = \frac{b_w - 2 b_n}{2 b_w - b_n} \quad (3)$$

In Tabelle 3 finden sich die entsprechenden Werte für  $b_w$  und  $b_n$  mit ihrer Fehlergrenze  $\sigma_b$ , die aus den Daten der Tabelle 2 berechnet wurden.

Tabelle 2. Molekulargewichte und Bruchwahrscheinlichkeit von DNS aus bestrahltem Nukleoprotein (Mittelwert  $\pm \sigma_M$  aus 4 Bestimmungen).

Konz. Nukleoprotein	Dosis (MR)	DNS	$M_w \cdot 10^{-6}$	$M_n \cdot 10^{-6}$	A bzw. $\alpha \cdot 10^{-4}$
0,53	0	nativ	10,81 $\pm$ 0,167	5,67 $\pm$ 0,633	
0,53	0,5	nativ	7,82 $\pm$ 0,265	5,02 $\pm$ 0,200	0,178 $\pm$ 0,0458
0,53	1,0	nativ	5,73 $\pm$ 0,10	3,82 $\pm$ 0,096	0,559 $\pm$ 0,0434
0,53	1,5	nativ	5,30 $\pm$ 0,372	3,10 $\pm$ 0,171	0,955 $\pm$ 0,106
0,53	2,0	nativ	5,10 $\pm$ 0,978	2,83 $\pm$ 0,535	1,265 $\pm$ 0,188
0,53	4,0	nativ	3,30 $\pm$ 0,244	1,90 $\pm$ 0,070	2,139 $\pm$ 0,080
0,53	5,0	nativ	1,83 $\pm$ 0,135	1,21 $\pm$ 0,090	4,078 $\pm$ 0,346
0,53	6,0	nativ	1,69 $\pm$ 0,096	1,14 $\pm$ 0,075	4,414 $\pm$ 0,387
0,53	0	denat.	3,19 $\pm$ 0,10	1,36 $\pm$ 0,04	
0,53	0,5	denat.	1,62 $\pm$ 0,191	0,90 $\pm$ 0,14	0,574 $\pm$ 0,167
0,53	1,0	denat.	1,00 $\pm$ 0,049	0,583 $\pm$ 0,039	3,01 $\pm$ 0,21
0,53	1,5	denat.	0,859 $\pm$ 0,028	0,527 $\pm$ 0,044	3,58 $\pm$ 0,247
0,53	2,0	denat.	0,820 $\pm$ 0,026	0,486 $\pm$ 0,037	4,18 $\pm$ 0,54
0,53	4,0	denat.	0,514 $\pm$ 0,052	0,300 $\pm$ 0,043	8,81 $\pm$ 1,415
0,53	5,0	denat.	0,418 $\pm$ 0,070	0,230 $\pm$ 0,054	13,62 $\pm$ 3,71
0,53	6,0	denat.	0,372 $\pm$ 0,018	0,174 $\pm$ 0,019	16,12 $\pm$ 2,14
0,20	0	nativ	13,59 $\pm$ 0,99	7,64 $\pm$ 0,212	
0,20	0,5	nativ	4,78 $\pm$ 0,26	3,26 $\pm$ 0,207	1,105 $\pm$ 0,107
0,20	1,0	nativ	4,13 $\pm$ 0,216	2,46 $\pm$ 0,088	1,709 $\pm$ 0,091
0,20	2,0	nativ	1,82 $\pm$ 0,051	1,14 $\pm$ 0,080	4,672 $\pm$ 0,39
0,20	0	denat.	2,36 $\pm$ 0,099	1,30 $\pm$ 0,139	
0,20	0,5	denat.	0,770 $\pm$ 0,0310	0,428 $\pm$ 0,0405	6,32 $\pm$ 0,89
0,20	1,0	denat.	0,516 $\pm$ 0,0314	0,331 $\pm$ 0,0328	9,04 $\pm$ 1,10
0,20	2,0	denat.	0,225 $\pm$ 0,0060	0,121 $\pm$ 0,0075	29,32 $\pm$ 2,24

### Strahlenempfindlichkeit der DNS im Chromatin

Tabelle 3. Neigung  $b \pm \sigma_b$  der Regressionsgeraden  $\frac{1}{M}$  gegen die Dosis (in R).

Konz. Nukleo- DNS protein		$b_w \cdot 10^{13}$	$b_n \cdot 10^{13}$	P
0,53 nativ		$5,386 \pm 0,597$	$9,01 \pm 0,305$	0,178
0,53 denat.		$41,75 \pm 7,21$	$67,47 \pm 7,97$	0,158
0,20 nativ		$2,20 \pm 0,255$	$3,74 \pm 0,228$	0,070
0,20 denat.		$20,19 \pm 0,618$	$37,45 \pm 2,357$	0,250

Nach Gleichung [3] liegen nur dann Vernetzungen vor, wenn  $b_n > 2 b_w$ . In allen vier Fällen ist jedoch  $b_n < 2 b_w$ ; es sind somit keine Vernetzungen eingetreten. Auch unter Berücksichtigung der Fehlergrenze von  $b$  sind Vernetzungen nur wenig wahrscheinlich. In Tabelle 3 ist angegeben, wie groß die Wahrscheinlichkeit (P) ist, daß  $b_n = 2 b_w$ , also überhaupt Vernetzungen entstehen. In diesem Fall ist aber immer noch  $p_0/q_0$  unendlich groß. Für unsere weiteren Betrachtungen können deshalb Vernetzungen zwischen DNS-Molekülen vernachlässigt werden.

Die Temperaturabhängigkeit der optischen Dichte findet sich in Abbildung 5. In der Legende sind die dazugehörigen Schmelzpunkte  $T_m$  angegeben. Es ergibt sich in Übereinstim-

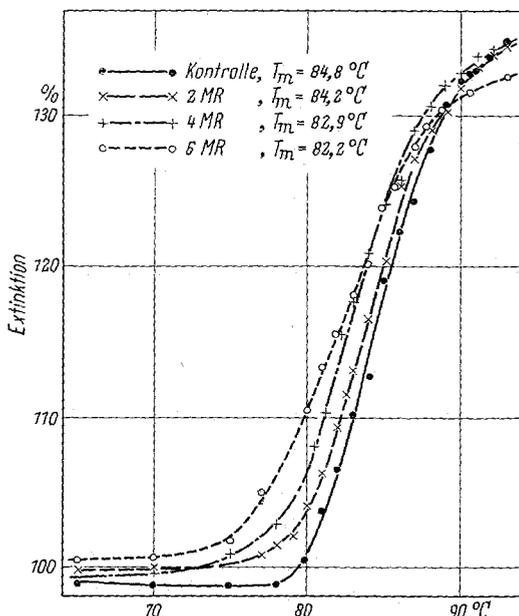


Abb. 5. Temperaturabhängigkeit der optischen Dichte von DNS-Präparationen aus unbestrahltem und bestrahltem Nukleoprotein.

mung mit früheren Untersuchungen [1] eine stetige Erniedrigung des Schmelzpunktes mit steigender Dosis.

### Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung wurde Nukleoprotein als Gel bei einer Konzentration von 0,53 und 0,20 bestrahlt. Ebenso wie nach Bestrahlung trockener DNS [3] fanden wir, daß in den Nukleoproteingelen die Bruchwahrscheinlichkeit für Doppelbrüche linear mit der Dosis ansteigt. Das deutet darauf hin, daß auch die Doppelbrüche auf ein einzelnes Absorptionseignis zurückzuführen sind. Zusätzlich entstehen aber auch Doppelbrüche durch gegenüberliegende Einzelbrüche [4]. In dem von uns untersuchten Dosisbereich war dieser Anteil der Doppelbrüche jedoch so gering, daß er vernachlässigt werden konnte.

Nach Bestrahlung isolierter DNS treten zwischen den Molekülen Vernetzungen auf. Das Verhältnis zwischen Brüchen und Vernetzungen beträgt in wäßriger Lösung etwa 3 bis 4 [4, 6] und bei trocken bestrahlter DNS etwa 1 [3]. Da uns aus den Molekulargewichtsbestimmungen  $M_w$  und  $M_n$  bekannt sind, konnten wir prüfen, ob auch im Nukleoprotein zwischen zwei DNS-Molekülen Vernetzungen eintreten. Die Meßwerte ergaben keinen Anhaltspunkt für die Vernetzungen, unabhängig von dem Feuchtigkeitsgehalt der Nukleoproteingele. Offenbar liegen in den untersuchten Nukleoproteingelen die DNS-Moleküle getrennt voneinander vor und sind einzeln von einem Histomantel umhüllt.

Die Linearität der Beziehung zwischen Bruchwahrscheinlichkeit und Dosis gestattet die Berechnung der G-Werte für den Einzel- sowie den Doppelbruch. Für Einzelbrüche ergaben sich G-Werte von 0,202 ( $c = 0,53$ ) und 0,381 ( $c = 0,20$ ) und für Doppelbrüche 0,022 und 0,031. Zum Vergleich seien in der Tabelle 4 einige G-Werte zusammengestellt, die in der Literatur für Einzel- oder Doppelbrüche unter den verschiedensten Bestrahlungsbedingungen angegeben sind. Für Bestrahlungen isolierter DNS ergeben sich für Einzelbrüche Werte von 125 bis 370 eV und für Doppelbrüche 600 bis 900 eV.

Für Bruchereignisse nach Bestrahlung *in vivo* liegen nur wenig zuverlässige Werte vor. Neben den relativ hohen G-Werten für den Ein-

Tabelle 4. G-Werte für Einzel- und Doppelbrüche in der DNS

Bestrahlungsart	Bruchereignis	G-Wert	Energiebedarf pro Bruch (eV)	Autor
Trockene DNS im Vakuum	Einzelbruch	0,63	160	(3)
DNS-Lösung 5,0 mg/ml	Einzelbruch	0,8	125	(29)
DNS-Lösung 1,0 mg/ml	Einzelbruch	0,4	250	(29)
DNS-Lösung 0,2 mg/ml	Einzelbruch	0,27	370	(4)
DNS in M.radiodurans	Einzelbruch	0,715	140	(30)
DNS in Leukämiezellen	Einzelbruch	0,66	150	(28)
Nukleoproteingel, c = 0,53	Einzelbruch	0,202	495	diese Arbeit
Nukleoproteingel, c = 0,20	Einzelbruch	0,381	263	diese Arbeit
Trockene DNS im Vakuum	Doppelbruch	0,11	909	(3)
Trockene DNS	Doppelbruch	0,125	800	(25)
DNS-Gel, c = 0,25	Doppelbruch	0,16	600	(31)
T1-Phagen in 4mal NB	Doppelbruch	0,080	1250	(32, 6)
Nukleoproteingel, c = 0,53	Doppelbruch	0,022	4500	diese Arbeit
Nukleoproteingel, c = 0,20	Doppelbruch	0,031	3230	diese Arbeit

zelbruch in bestrahlten Zellen von 0,7 [28, 30], lassen sich die Untersuchungen von *Hotz* und *Zimmer* [32] heranziehen, nach denen T1-Phagen in vierfacher Nährbouillon durch etwa 500 eV inaktiviert werden. Nach den Untersuchungen von *Bohne* u. a. [6] werden unter den gleichen Versuchsbedingungen 0,4 Doppelbrüche gemessen. Zur Erzeugung eines Doppelbruchs in den Phagen sind demnach 1250 eV notwendig.

Die G-Werte für den Einzelbruch im bestrahlten Nukleoproteingel sind relativ hoch. Im Gegensatz zu den Bestrahlungsversuchen mit verdünnten Nukleoproteinlösungen [13, 14, 16] besitzt der Proteinanteil nur eine geringe Schutzwirkung. Im konzentrierten Nukleoproteingel (c = 0,53) vermag das Protein entsprechend seinem Gewichtsanteil nur etwa die Hälfte der Strahlenwirkung auf die DNS abzuschirmen. Bei höherem Wassergehalt (c = 0,20) wird ein G-Wert erreicht, der auch in wäßrigen Lösungen gemessen wird. Offenbar wird die Beweglichkeit der aus dem Wasser entstehenden Radikale so groß, daß das Protein nur wenige von ihnen zu binden vermag. Es besteht dabei die Möglichkeit, daß das im Nukleoproteingel vorhandene Wasser vor allem um die Doppelhelix der DNS eingelagert ist.

Anders ist es bei den Doppelbrüchen. Hier ist nur die in der DNS selbst absorbierte Energie wirksam. Im konzentrierten Nukleoproteingel beträgt der G-Wert — entsprechend der DNS-Konzentration von 0,24 — nur noch ein Viertel des in DNS-Gelen gemessenen Wertes. Bei höherem Wassergehalt des Nukleoproteins

(c = 0,20) steigt jedoch der G-Wert an, obwohl die Gesamtmenge an DNS pro g Nukleoproteingel geringer ist. Es ist möglich, daß dies durch einen erhöhten Quellungszustand der DNS bedingt ist.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sich in einem Nukleoproteingel die auf die DNS oder auf den Proteinanteil treffenden Strahlenreaktionen nicht allein aus dem jeweiligen Gewichtsverhältnis ergeben. Vielmehr muß der Wassergehalt der einzelnen Komponenten berücksichtigt werden, jedoch fehlen hierzu noch sichere experimentelle Unterlagen. Dies gilt auch für das Chromatin des lebenden Zellkerns. Da der Wassergehalt des Zellkerns relativ hoch ist (80%) [33], ist es möglich, daß die Einzelbrüche vorzugsweise durch diffusible Radikale aus dem Wasser hervorgerufen werden — ebenso wie im Nukleoprotein von 80% Wasser. Doppelbrüche entstehen durch Primärionisationen innerhalb des von der DNS eingenommenen Volumens. Unsere Ergebnisse am Nukleoprotein haben gezeigt, daß dieses nicht allein aus seinem Gewichtsanteil erschlossen werden kann.

Unsere Untersuchungen über die Abnahme des Schmelzpunktes der DNS nach Bestrahlung erlauben einige Überlegungen über die Ursache dieses Strahleneffekts. Früher wurde diskutiert [1], ob nicht die strahlenbedingten Einzelbrüche in der Nukleotidkette die Erniedrigung des Schmelzpunktes bedingen, da für die Entspiralisierung der Helix mehr Ausgangspunkte bestehen. Diese Annahme kann gestützt werden, wenn man die Verschiebung

des Schmelzpunktes mit der Zahl der Einzelbrüche vergleicht und nachsieht, ob diese Beziehung auch unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen gilt.

Wir berechnen jeweils die Bruchwahrscheinlichkeit des Einzelstranges für die Dosis, die den Schmelzpunkt um  $1^{\circ}\text{C}$  senkt. Bei Bestrahlung des Nukleoproteingels von  $c = 0,53$  ist dies  $5,32 \cdot 10^{-4}$ . Bestrahlt man DNS-Lösungen ( $200 \mu\text{g/ml}$ ,  $0,2 \text{ m NaCl}$ ), so ergeben sich nach Auswertung der Daten von Hagen [4] und Ulrich [22]  $5,67 \cdot 10^{-4}$  Einzelbrüche pro Bindung und pro Dosis, welche zu  $1^{\circ}\text{C}$  Schmelzpunktniedrigung führt.

Dagegen ist die Zahl der Doppelbrüche bei der entsprechenden Dosis ganz unterschiedlich. Im bestrahlten Nukleoprotein betragen sie  $1,2 \cdot 10^{-4}$  und in DNS-Lösungen  $0,2 \cdot 10^{-4}$ . Untersuchungen über den Schmelzpunkt der DNS nach UV-Bestrahlung [34] zeigen zudem, daß eine isolierte Schädigung der Basen zu ganz anderen Schmelzkurven führt, als man nach Einwirkung ionisierender Strahlung beobachtet. Diese Überlegungen machen es zumindest nicht unwahrscheinlich, daß vor allem Einzelbrüche in der DNS-Helix die Ursache der Verschiebung des Schmelzpunktes der bestrahlten DNS sind.

#### Zusammenfassung

Desoxyribonukleoprotein wird als feuchtes Gel mit einer Konzentration von 0,53 und 0,20 mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlen bestrahlt, die DNS vom Protein getrennt und anschließend die Strahlenschäden in der DNS untersucht. Als Kriterien dafür dienten die Brüche im Einzel- und Doppelstrang, das Auftreten von Vernetzungen und die Verschiebung des Schmelzpunktes. Einzelbrüche wie Doppelbrüche steigen linear mit der Dosis an. Dabei sind Einzelbrüche etwa 10mal häufiger als Doppelbrüche. Es ist wahrscheinlich, daß die Doppelbrüche auf die direkte Absorption der Strahlenenergie in der DNS zurückzuführen sind. Die Einzelbrüche entstehen dagegen vorwiegend durch diffusible Radikale aus dem Histonmantel. Vernetzungen konnten nach Bestrahlung der DNS im Nukleoprotein-Gel nicht festgestellt werden. Die Ursachen der strahlenbedingten Verschiebung des Schmelzpunktes der DNS werden diskutiert.

#### Summary

Deoxyribonucleoprotein has been irradiated as wet gel with  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -rays at a concentration of 0.53 and 0.20. After irradiation, the DNA was separated from the protein. Single and double strand breaks, crosslinks and the shift of the melting point were used as criteria for radiation effects in the DNA. Single and double strand breaks increase linearly with the dose. 10 times more single breaks are found than double breaks. Whereas double breaks are due to the primary ionisation within the DNA molecule, single breaks are formed mostly by diffusible radicals formed in the water. There was no indication, that crosslinks between DNA molecules occur in the nucleoprotein gel. The mechanism of the radiation induced shift of the melting point is discussed.

#### Résumé

Des gels de désoxyribonucléoprotéines aux concentrations 0,53 et 0,20 sont soumis au rayonnement  $\gamma$  d'une source de cobalt 60. On a recherché les radiolésions de l'ADN après l'avoir séparé des protéines. Les critères de l'altération de la structure de l'ADN sont les ruptures de la double hélice et d'une seule chaîne, les branchements et le déplacement du point de transition. Les cassures simples et les cassures doubles sont proportionnelles à la dose, les cassures simples restant toujours 10 fois plus fréquentes que les cassures doubles. Les cassures doubles sont vraisemblablement dues à l'absorption directe de l'énergie du rayonnement. Les cassures simples, par contre, résultent surtout des radicaux diffusibles provenant du manteau d'histones. On n'a pas pu mettre en évidence de branchements dans l'ADN après son irradiation sous forme de gel nucléoprotidique. L'origine du déplacement du point de transition dû à l'irradiation est discutée.

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] Hagen, U.: Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 134 (1967), 45.
- [5] Freifelder, D.: Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 54 (1965), 128.
- [6] Bohne, L., T. Coquerelle, U. Hagen: Stud. biophys. 7 (1968), 117.
- [7] Kaplan, H. S.: In: G. Silini (Ed.), Radiation Research, S. 397. Amsterdam 1967.
- [8] Hagen, U., K. Keck, F. Zimmermann, H. Kröger: Strahlentherapie 132 (1967), 40.
- [9] Zubay, G., M. H. F. Wilkins: J. Mol. Biol. 4 (1962), 444.
- [10] Olins, D. E., A. L. Olins, P. H. von Hippel: J. Mol. Biol. 24 (1967), 157.
- [11] Taylor, J. H.: Int. Rev. Cytol. 13 (1962), 39.
- [12] Luzzati, V., A. Nicolaieff: J. Mol. Biol. 7 (1963), 142.
- [13] Emmerson, P., G. Scholes, D. H. Thomson, J. F. Ward, J. J. Weiss: Nature 187 (1960), 319.
- [14] Peacocke, A. B., B. N. Preston: Nature 192 (1961), 228.
- [15] Weiss, J. J.: Progr. Nucl. Acid. Res. Biol. 3, S. 103. New York-London 1964.
- [16] Tschahitschi, A.: Diss. Freiburg/Brsg. 1966.
- [17] Burton, K.: Biochem. J. 62 (1956), 315.
- [18] Vokin, E., E. E. Cohn: In: Methods of Biochemical Analysis, Vol. I. New York-London 1954.
- [19] Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall: J. Biol. Chem. 193 (1951), 265.
- [20] Dounce, A. L., B. B. Love, J. de Simone, M. S. Mackay: In: Proc. Int. Symp. on the Cell Nucleus, Metabolism and Radiosensitivity. London 1966.
- [21] Coquerelle, Th., L. Bohne, U. Hagen, J. Merkwitz: Manuskript (in Vorber.).
- [22] Ulrich, M.: Diss. Karlsruhe 1967.
- [23] Eigner, J., C. Schildkraut, P. Doty: Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 55 (1962), 13.
- [24] Eigner, J., P. Doty: J. Mol. Biol. 12 (1965), 549.
- [25] Lett, J. T., K. A. Stacey, P. Alexander: Radiat. Res. 14 (1961), 349.
- [26] Schulz, G. V.: Z. phys. Chem. 51 (1942), 127.
- [27] Charlesby, A.: Atomic Radiation and Polymers. Oxford 1960.
- [28] Lett, J. T., J. Caldwell, C. J. Dean, P. Alexander: Nature 214 (1967), 790.
- [29] Collyns, B., S. Okada, G. Scholes, J. J. Weiss, C. M. Wheeler: Radiat. Res. 25 (1965), 526.
- [30] Dean, C. J., P. Feldschreiber, J. T. Lett: Nature 209 (1966), 49.
- [31] Lett, J. T., P. Alexander: Radiat. Res. 15 (1961), 159.
- [32] Hotz, G., K. G. Zimmer: Int. J. Radiat. Biol. 7 (1963), 75.
- [33] Hofmeier, G., E. Grundmann: Beitr. path. Anat. 126 (1962), 413.
- [34] Hagen, U., K. Keck, H. Kröger, F. Zimmermann, Th. Lücking: Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 95 (1964), 418.

Anschrift d. Verff.: Dr. H. Weinert und Prof. Dr. Dr. U. Hagen, Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum, 75 Karlsruhe, Postfach 3640.

Herrn Dr. Klaus Keck danken wir für den Aufbau der Apparatur zur Messung des Schmelzpunktes der DNS.