

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

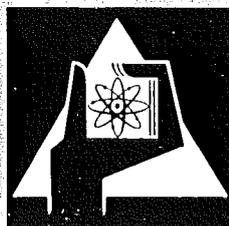
September 1970

KFK 1321

Institut für Strahlenbiologie

UV-induzierte Brüche in 5-Bromuracil-substituierter DNS
des Phagen T1

G. Stephan, H.G. Miltenburger, G. Hotz



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.
KARLSRUHE

UV-induzierte Brüche in 5-Bromuracil-substituierter DNS des Phagen T1

UV-Induced Strand Breaks in 5-Bromouracil Substituted DNA of Phage T1

G. STEPHAN, H. G. MILTENBURGER * und G. HOTZ

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforsch. 25 b, 1037—1042 [1970]; eingegangen am 18. April 1970)

Phage T1 and BU-T1 (phage DNA substituted with 5-bromouracil) were inactivated by UV-light (2537 Å). After irradiation DNA was extracted and its sedimentation behaviour studied by zone centrifugation in neutral and alkaline sucrose gradients, respectively. In the DNA of unsubstituted phage no double-strand breaks and only a small number of single-strand breaks per inactivation dose could be detected after high UV-doses. However, after irradiation of phage BU-T1 double- and single-strand breaks were observed at an increased rate. UV-irradiation in the presence of a radical scavenger (0.01 M cysteamine) prevented the occurrence of double- but not of single strand breaks. The relevance of these breaks attributable to BU-incorporation for the biological activity (plaque forming ability) of the phage and the site of action of cysteamine are discussed.

Die Substitution von Thymin durch 5-Bromuracil (BU) in der Nucleinsäure (DNS) von Bakterien und Bakteriophagen hat eine Empfindlichkeitssteigerung der Koloniebildungsfähigkeit der genannten biologischen Einheiten gegenüber ultravioletter und ionisierender Strahlung zur Folge^{1, 2}. Erste Hinweise auf die Ursache dieser Sensibilisierung wurden von MARMUR und Mitarbb.³ erbracht. Nach UV-Bestrahlung BU-substituierter DNS aus *Escherichia coli* beobachteten sie eine Abnahme des Sedimentationskoeffizienten. Die BU-bedingte Sensibilisierung der biologischen Aktivität von Phagen⁴⁻⁶, transformierender⁷ als auch infektiöser⁸ DNS wird bei Bestrahlung in Anwesenheit von Radikalfängern, wie z. B. 2-Merkaptoäthylamin (Cysteamin) weitgehend reduziert. Dieser Befund führte zur Aufstellung einer Arbeitshypothese, wonach Radikalreaktionen eine wesentliche Rolle bei der Strahleninaktivierung BU-substituierter Phagen spielen^{5, 9}. Die Beobachtung, daß ausschließlich bei BU-substituierten Phagen eine UV-bedingte Veränderung an der Desoxyribose der DNS nachgewiesen wurde, ließ das

Auftreten von Strangbrüchen in BU-DNS vermuten⁹.

In diese Richtung wiesen auch neuere Versuche an BU-substituierten Bakterien des Stammes *Escherichia coli*, deren Ergebnis eine erhöhte Rate von DNS-Doppelstrangbrüchen nach ionisierender Bestrahlung war¹⁰. Eine vermehrte Anzahl von Einzelstrangbrüchen und ihre Beeinflussung durch Cysteamin wurde bei BU-substituierten T3-Phagen nach UV-Bestrahlung beobachtet¹¹.

In der vorliegenden Arbeit sollen mittels Zonen-zentrifugation in einem Saccharosegradienten die Sedimentations-Eigenschaften der DNS nach UV-Bestrahlung von BU-substituierten und nicht-substituierten T1-Phagen sowie die Beeinflussung dieser Eigenschaften durch Bestrahlung der Phagen in Anwesenheit von Cysteamin untersucht werden.

Material und Methoden

Der für die vorliegenden Versuche verwendete Phage T1 (Wildtyp) und dessen Wirtszelle *Escherichia coli B* wurden uns 1958 vom Institut für Genetik der Universität Köln zur Verfügung gestellt und seitdem

* Zoologisches Institut der Technischen Hochschule, Darmstadt.

¹ S. GREER and S. ZAMENHOF, Amer. chem. Soc. Abstr. 131st Meeting, 3c [1957].

² F. W. STAHL, J. M. CRASEMAN, L. OKUN, E. FOX, and C. LAIRD, Virology 13, 98 [1961].

³ J. MARMUR, W. F. ANDERSON, L. MATTHEWS, K. BERNIS, E. GAJEWSKA, D. LANE, and P. DOTY, J. cellular comparat. Physiol. 58, 33 [1961].

⁴ G. HOTZ, Biochem. biophysic. Res. Commun. 11, 393 [1963].

⁵ W. D. RUPP and W. H. PRUSOFF, Nature [London] 202, 1288 [1964].

⁶ M. RADMAN, A. ROLLER, and M. ERRERA, Molecular Gen. Genetics 104, 152 [1969].

⁷ M. H. PATRICK and C. S. RUPERT, Photochem. Photobiol. 6, 1 [1967].

⁸ G. HOTZ and R. MAUSER, Molecular Gen. Genetics, im Druck.

⁹ G. HOTZ and H. REUSCHL, Molecular Gen. Genetics 99, 5 [1967].

¹⁰ H. S. KAPLAN, Genetics 55, 1442 [1966].

¹¹ M. B. LION, Presented to Third International Congress of Radiation Research, Cortina d'Ampezzo 1966, Abstracts, p. 142.



als Laborstämme in Passagen weitergeführt. Die Titration der Phagen erfolgte auf Farbindikatorplatten und wurde bereits früher beschrieben¹².

Der Einbau von ¹⁴C-markiertem 5-Bromuracil (spez. Aktivität 14,5 μ Ci/mg; 20 μ g/ml) bzw. Thymin (spez. Aktivität 17 μ Ci/mg; 20 μ g/ml) erfolgte nach einer modifizierten Methode von STAHL und Mitarbb.² Beide radioaktiven Substanzen wurden von Dr. SCHWEER (Institut für Strahlenchemie, Kernforschungszentrum Karlsruhe) synthetisiert.

Die endgültige Reinigung und Konzentrierung der Phagen erfolgte durch Zentrifugation in einem CsCl-Dichtegradienten mit anschließender Dialyse gegen Bacto Nährbouillon (0,8%) (Difco, USA). Bei Aufbewahrung der radioaktiven Phagenkonzentrate in Puffer beobachteten wir ein Absinken der biologischen Aktivität innerhalb 10 Tage auf weniger als 10% bei gleichzeitiger Degradierung des DNS-Einzelstrangs.

Zur Bestrahlung verwendeten wir einen Quecksilber-niederdruckbrenner (Quarzlampen-Gesellschaft m.b.H., Hanau; Typ NK 6/20). In einem Abstand von 45 cm betrug die Dosisleistung 1,6 erg/mm²·sec. 95% des erzeugten Lichts hat die Wellenlänge 2537 Å. War die Applikation höherer Strahlendosen erforderlich, wurde mit einem leistungsfähigeren Quecksilber-niederdruckbrenner (Grüntzel, Karlsruhe; Vycorglas) bestrahlt. Die Dosisleistung dieser Lampe betrug in einem Abstand von 22 cm das 54,5-fache des kleinen Brenners. Der Dosimetrie beider UV-Lampen wurden die Inaktivierungsdosen für den Phagen T4 ($D_{1\%} = 230$ erg/mm²) zugrunde gelegt¹³. Vor der Bestrahlung dialysierten wir die Phagen 18 Stdn. gegen Adsorptionspuffer¹⁴ und stellten anschließend den Titer auf $6 \cdot 10^{11}$ /ml ein. 0,6 ml solcher Suspensionen wurden in einer kleinen Kristallisierschale in dünner Schicht unter Rühren bestrahlt. Bei Anwesenheit von 0,01 M Cysteamin·HCl (Calbiochem, USA) betrug die Transmission des Lichts der benutzten Wellenlänge bei einer Schichtdicke von 1 mm etwa 90 Prozent.

Zur Extraktion der DNS nahmen wir 0,5 ml einer Phagensuspension mit einem Titer von $6 \cdot 10^{11}$ /ml, die mit Duponol und Phenol behandelt wurden¹⁵. Anschließend wurde die DNS 18 Stdn. bei 4 °C gegen NCE-Puffer (10,5 g NaCl, 5,9 g Na-citrat, 100 ml 0,1 M EDTA in 1 l aqua bidest.) mit 10^{-5} M Spermin dialysiert. Die Konzentration der DNS bestimmten wir auf photometrischem Wege (Extinktion ($_{260}^{0.1\text{cm}}$) $\cdot 47 \cong \mu$ g T1-DNS/ml). Bei allen Arbeiten mit DNS-Lösungen verwendeten wir Pipetten mit abgeschliffener Spitze (innerer $\phi > 0,9$ mm).

Zur Zonenzentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten wurde mittels einer Mischvorrichtung¹⁶ ein linearer Konzentrationsgradient (5–20%) in die Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Diese Lösung (4,6 ml) über-

schichteten wir beim neutralen Gradienten (Saccharose in 1 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl-Puffer, 10^{-3} M EDTA; pH 7,5) zuerst mit 0,2 ml Tris-Puffer und danach mit 4 μ g DNS in 0,2 ml NCE-Puffer. Beim alkalischen Gradienten (Saccharose in 0,9 M NaCl, 0,1 M NaOH, 10^{-3} M EDTA; pH 12,5) wurde mit 0,2 ml 0,5 M NaOH anstatt Puffer überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte in einem Schwingbecherrotor SW 50L (Spinco, Modell L2-65K) während 3,5 Stdn. bei 35000 U/min und 20 °C und begann stets mit einem Vorlauf von 7 min bei 5000 U/min. Nach dem Lauf wurde der Boden der Zellulose-Nitrat-Röhrchen angestochen, die ausfließenden Tropfen in der Weise fraktioniert, daß jeweils 3 Tropfen zur Messung der ¹⁴C-Radioaktivität auf Glasfaser-Filterpapier (ϕ 2 cm; Schleicher und Schüll Nr. 6) aufgefangen und die 5 folgenden Tropfen verworfen wurden, usw. Die Zahl der auf diese Weise erhaltenen Fraktionen betrug beim neutralen Gradienten durchschnittlich 49, beim alkalischen 47.

Nach Trocknung der Filterplättchen bei 37 °C wurden diese anschließend mit 1 ml Trichloressigsäure, 10 ml absolutem Alkohol und 10 ml Aceton gewaschen, nach erneutem Trocknen der Proben pro Fläschchen 10 ml Scintillationsflüssigkeit (0,1 g POPOP, 4 g PPO/1 Toluol) eingefüllt und die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsscintillationszähler (Mark I, Nuclear Chicago) bei 0 °C gemessen. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde in Prozent der Aktivität einer Kontrolle (2 μ g DNS) ausgedrückt und gegen die Zahl der Fraktionen graphisch aufgetragen.

Ergebnisse

1. Sedimentationsverhalten der DNS nach Bestrahlung nicht-substituierter Phagen

Abb. 1 zeigt das Sedimentationsverhalten nativer DNS nach der Extraktion aus unbestrahlten bzw. bestrahlten Phagen. Sowohl die Kontrolle als auch die DNS aus bestrahlten Phagen sedimentieren als Zonen mit enger Verteilung der Radioaktivität. Die scharfen Sedimentationsbänder lassen auf ein einheitliches Mol.-Gew. der DNS-Moleküle schließen.

Die Phagen wurden einer UV-Dosis von $1,3 \cdot 10^4$ erg/mm² ausgesetzt, was etwa einer Inaktivierung der Kolonie- bzw. Plaquebildungsfähigkeit mit 80 Inaktivierungsdosen (1 Inaktivierungsdosis = $D_{37\%}$), bzw. 80 phagenletalen Treffern (PLT) entspricht¹⁷. Trotzdem sind gegenüber der Kontrolle (DNS aus unbestrahlten Phagen) keine signifikanten Verände-

¹² G. HOTZ and A. MÜLLER, Z. Naturforsch. **15** b, 450 [1960].

¹³ R. B. SETLOW and R. BOYCE, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **68**, 455 [1963].

¹⁴ A. D. HERSHEY and M. CHASE, J. gen. Physiol. **36**, 39 [1952].

¹⁵ J. D. MANDELL and A. D. HERSHEY, Analyt. Biochem. [New York] **1**, 66 [1960].

¹⁶ R. J. BRITTON and R. B. ROBERTS, Science [Washington] **131**, 32 [1960].

¹⁷ F. W. STAHL, in BURNET and STANLEY: The Viruses, Vol. 2, p. 355, Academic Press, New York 1959.

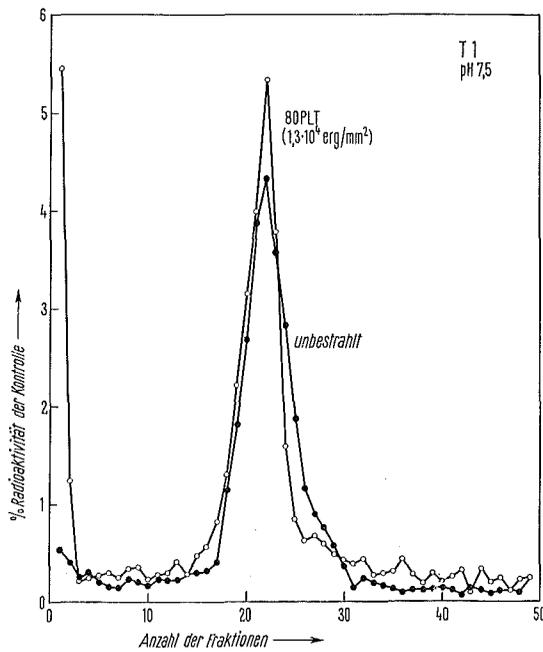


Abb. 1. Sedimentationsverhalten nativer DNS vor und nach UV-Bestrahlung von T1-Phagen mit der angegebenen Dosis in erg/mm^2 bzw. phagenletalen Treffern (PLT).

rungen des Sedimentationsverhaltens bestrahlter DNS festzustellen.

Nach Denaturierung wurde die einzelsträngige DNS im alkalischen Gradienten (pH 12,5) untersucht. Das Sedimentationsverhalten ist in Abb. 2 dargestellt. Im Gegensatz zur nativen DNS besitzen die unbestrahlten Einzelstränge kein einheitliches

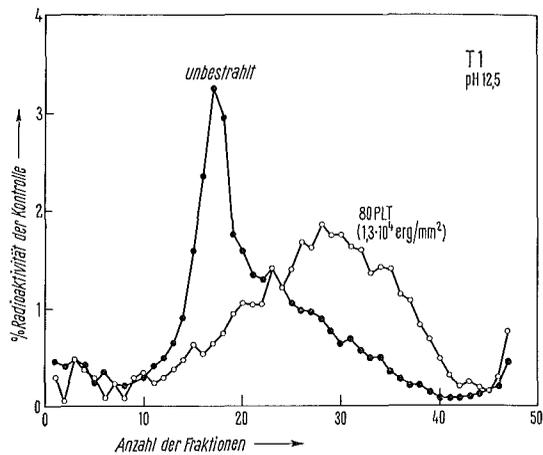


Abb. 2. Sedimentationsverhalten alkalisch denaturierter DNS vor und nach UV-Bestrahlung von T1-Phagen mit der angegebenen Dosis in erg/mm^2 bzw. phagenletalen Treffern (PLT).

Mol.-Gew. Vergleicht man die Flächen unter den Kurven der Abb. 2, so findet man, daß nach der Applikation einer UV-Dosis von $1,3 \cdot 10^4 \text{ erg}/\text{mm}^2$ 32% der Moleküle langsamer als die Kontrolle sedimentieren. Aus diesem Sedimentationsverhalten kann man schließen, daß erst nach hohen UV-Dosen Einzelstrangbrüche in nicht-substituierter T1-DNS auftreten oder zumindest eine erhöhte Labilität des bestrahlten Moleküls gegenüber Alkalibehandlung besteht.

2. Sedimentationsverhalten der DNS nach Bestrahlung BU-substituierter Phagen

Die Sedimentations-Verteilungen von DNS-Molekülen extrahiert aus BU-Phagen, die mit steigenden UV-Dosen bestrahlt wurden, sind in Abb. 3 dargestellt. Die Kontrolle ist der einer normalen, nicht BU-substituierten DNS vergleichbar (Abb. 1) und weist auf das Vorliegen von Molekülen einheitlicher Länge und Konfiguration hin. Nach einer UV-Dosis von $3 \cdot 10^2 \text{ erg}/\text{mm}^2$ (5 PLT) sind noch keine Moleküle nachweisbar, die eine von der Kontrolle abweichende Sedimentations-Geschwindigkeit besitzen. Nach einer Dosis von $1,2 \cdot 10^3 \text{ erg}/\text{mm}^2$ (20 PLT) beobachtet man jedoch eine langsamer sedimentierende Komponente, die nach der doppelten UV-Dosis weiter zunimmt und schließlich nach $4,8 \cdot 10^3 \text{ erg}/\text{mm}^2$ (80 PLT) 65% der Moleküle ausmacht. Die Zunahme dieser langsamer sedimentierenden DNS-Fraktion erklären wir mit einer dosisproportionalen Degradierung der Moleküle durch Doppelstrangbrüche.

Abb. 4 zeigt, daß DNS aus unbestrahlten BU-Phagen nach alkalischer Denaturierung eine ähnliche Heterogenität bezüglich der Sedimentation zeigt, wie dies bereits bei der DNS nicht-substituierter Phagen (Abb. 2) beschrieben wurde. Proportional der Dosis ist auch beim DNS-Einzelstrang eine Abnahme der Sedimentations-Geschwindigkeit zu beobachten, die sich in einer Verschiebung des Sedimentationsbandes nach rechts zum Meniskus hin ausdrückt. Die Verringerung der Sedimentations-Geschwindigkeit beruht auf einer Abnahme des Mol.-Gew. des Einzelstrangs als Folge strahleninduzierter Brüche.

3. Der Einfluß von Cysteamin auf das Sedimentationsverhalten der DNS

Abb. 5 zeigt das Ergebnis von Versuchen, bei denen BU-Phagen in Gegenwart von 0,01 M Cyste-

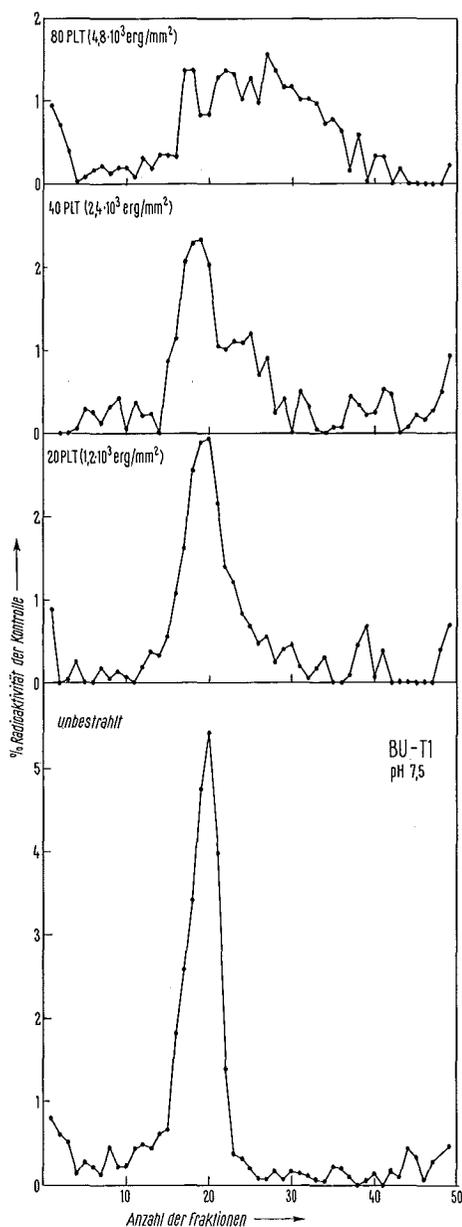


Abb. 3. Änderung des Sedimentationsverhaltens der nach Bestrahlung von BU-substituierten Phagen isolierten nativen DNS mit der UV-Dosis in erg/mm^2 bzw. phagenletalen Treffern (PLT).

amin mit einer UV-Dosis von $7 \cdot 10^3 \text{ erg}/\text{mm}^2$ (40 PLT) bestrahlt wurden. Das Sedimentationsverhalten der DNS extrahiert aus bestrahlten und unbestrahlten Phagen ist gleich. Hieraus schließen wir, daß das Auftreten der langsamer sedimentierenden DNS-Komponente, die bei derselben Inaktivierungs-

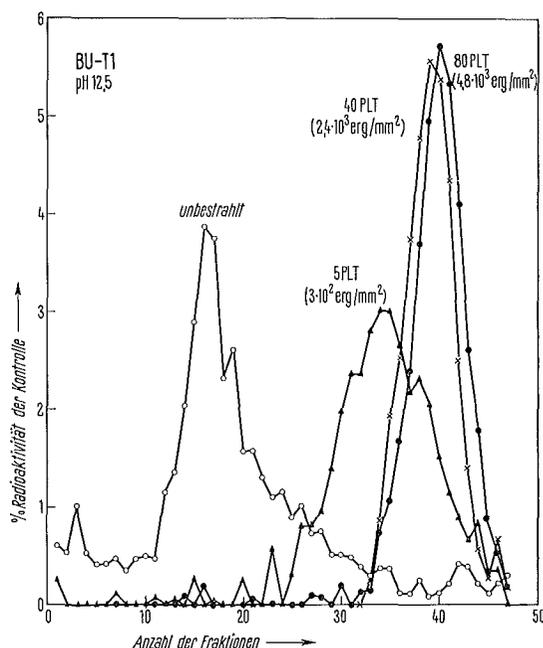


Abb. 4. Änderung des Sedimentationsverhaltens der nach Bestrahlung von BU-substituierten Phagen isolierten und alkalisch denaturierten DNS mit der UV-Dosis in erg/mm^2 bzw. phagenletalen Treffern (PLT).

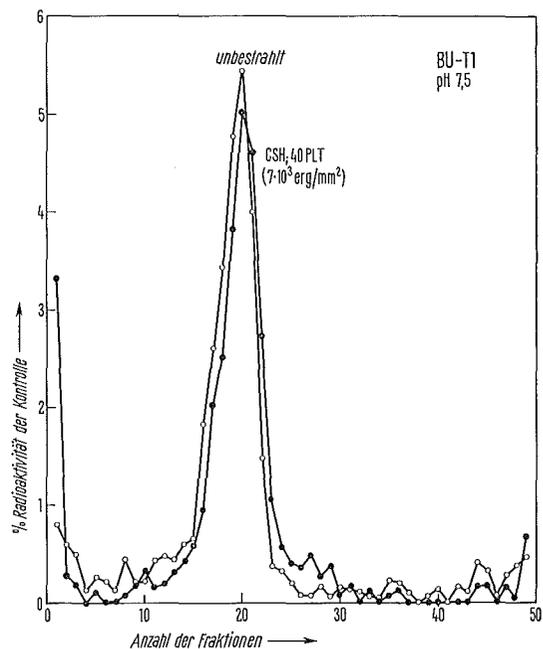


Abb. 5. Der Einfluß von 0,01 M Cysteamin (CSH) auf das Sedimentationsverhalten nativer DNS nach Bestrahlung von BU-T1-Phagen mit der angegebenen Dosis in erg/mm^2 bzw. phagenletalen Treffern (PLT).

rate der Phagen in Abwesenheit von Schutzstoff auftritt (Abb. 3), bei Anwesenheit von Cysteamin während der UV-Bestrahlung verhindert wird, d. h. Cysteamin schützt BU-substituierte DNS vor Doppelstrangbrüchen. Dieser Schutzeffekt konnte jedoch gegenüber Einzelstrangbrüchen nicht beobachtet werden.

Diskussion

Bei nicht-substituierten T1-Phagen waren selbst nach sehr hohen UV-Dosen keine Doppelstrangbrüche und nur eine für die Inaktivierung der biologischen Aktivität irrelevante Zahl von Einzelstrangbrüchen zu beobachten. Dieses Ergebnis weicht teilweise insoweit von an anderen Phagen gewonnenen Resultaten ab, als bei denaturierter DNS aus nicht-substituierten T2-¹⁸ und T4-Phagen^{19, 20}, die mit vergleichbaren Dosen ultravioletten Lichts bestrahlt worden waren, die Autoren keine langsamer als die Kontrolle sedimentierende Komponente feststellen konnten. Abgesehen davon, daß die unterschiedliche Basenzusammensetzung von gerad- und ungeradzahligem T-Phagen eine relativ höhere Bruchrate bei T1 zur Folge haben könnte, wäre es denkbar, daß der Einzelstrang von T1-DNS durch photochemische Prozesse gegenüber anschließender Alkalibehandlung labilisiert wird und erst bei der Denaturierung bricht.

Es wird heute allgemein angenommen, daß strahleninduzierte Doppelstrangbrüche in der DNS ein letales Ereignis bezüglich der biologischen Aktivität der Phagen darstellen²¹. Wären diese jedoch allein für den BU-Effekt verantwortlich, so müßte man pro inaktivierendem Ereignis im Mittel etwa einen Doppelstrangbruch erwarten. Das beobachtete Sedimentationsverhalten läßt jedoch ein Verhältnis erwarten, das zu klein ist, um dieser Forderung zu entsprechen. Aus diesem Grunde spielen Doppelstrangbrüche offensichtlich keine relevante Rolle bei der Strahlensensibilisierung 5-bromuracilsubstituierter T1-Phagen.

Strahleninduzierte Einzelstrangbrüche einer Phagen-DNS werden im allgemeinen von der Wirtszelle repariert²². Da diese Wirtszellreparatur UV-bestrahlter T1-DNS nach BU-Einbau jedoch blockiert ist²³, könnte in diesem Fall Einzelstrangbrüchen eine besondere Bedeutung zukommen.

Wird die UV-Bestrahlung in Gegenwart von Cysteamin durchgeführt, so ist die DNS, wie ihr Sedimentationsverhalten im neutralen Gradienten beweist, vor dem Auftreten von Doppelstrangbrüchen geschützt. Cysteamin hat jedoch keinen Einfluß auf die Erzeugung von Einzelstrangbrüchen. Am Phagen T4 wurden bereits ähnliche Untersuchungsergebnisse gewonnen²⁰. Hieraus muß gefolgert werden, daß mindestens zwei verschiedene Typen von BU-abhängigen Brüchen in T1-DNS auftreten. Der eine Typ führt durch Ereignisse in beiden komplementären Strängen zum Doppelbruch. Die Beeinflussung dieser Reaktion durch Cysteamin verhindert den Doppelbruch. Beim zweiten Typ handelt es sich um isoliert auftretende Einzelstrangbrüche, die die Kontinuität der Doppelhelix nicht zerstören. Quantitative Untersuchungen sind erforderlich, um das Verhältnis Einzel- zu Doppelstrangbruch nach Bestrahlung in An- bzw. Abwesenheit von Cysteamin zu bestimmen und damit die Richtigkeit unserer Ansicht zu prüfen. Da einerseits bei UV-Bestrahlung BU-substituierter T1-Phagen in Gegenwart von Cysteamin die Strahlensensibilisierung der Plaquebildungsfähigkeit aufgehoben wird⁴, andererseits aber unter diesen Bedingungen das Sedimentationsverhalten denaturierter DNS und somit die Zahl der Einzelstrangbrüche unbeeinflusst bleibt, kann beim Phagen T1 kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Strahlensensibilisierung nach BU-Einbau und DNS-Brüchen bestehen. Infolgedessen muß ein anderer Schaden für die Strahlensensibilisierung verantwortlich sein und dem Radikalfänger Cysteamin als Angriffspunkt dienen. Es ist plausibel, daß es sich hierbei um Läsionen in der BU-DNS handelt, die die Wirtszellreaktivierung blockieren und deren Entstehung bei der Bestrahlung in Anwesenheit von Cysteamin soweit unterdrückt wird, daß die Wirtszellreaktivierung wie bei normalen T1-Phagen ablaufen kann. Nach einer neueren Arbeitshypothese sollen photochemische Prozesse in der BU-DNS über eine Radikalreaktion am 5-Bromuracilmolekül zu einer Wasserstoffabstraktion an der Desoxyribose führen, die einen Strangbruch der DNS zur Folge hat. Diese Läsion der Desoxyribose wird bei Bestrahlung in Anwesenheit von Cysteamin verhindert⁹. Unsere Beobachtung, daß Einzelstrangbrüche

¹⁸ Y. MASAMUNE, *Molecular Gen. Genetics* **101**, 99 [1968].

¹⁹ A. W. KOZINSKI, W. ANDRAEJ, Z. K. LORKIEWICZ, and K. ZBIGNIEW, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **58**, 2109 [1957].

²⁰ G. HOTZ and R. WALSER, *Photochem. Photobiol.*, im Druck.

²¹ W. GINOZA, *Ann. Rev. Microbiol.* **21**, 325 [1967].

²² R. P. BOYCE and M. TREPPER, *Virology* **34**, 344 [1968].

²³ W. SAUERBIER, *Virology* **15**, 465 [1961].

auch bei Bestrahlung in Anwesenheit von Schutzstoff auftreten, kann damit erklärt werden, daß eine H-Abstraktion am Zucker zwar zu einem Strangbruch führt, dieser aber im Gegensatz zum Schaden an der Desoxyribose durch Cysteamin nicht beeinflußt werden kann. Unsere Ergebnisse deuten daraufhin, daß nicht das Öffnen der Zucker-Phosphatbindungen der DNS, sondern offenbar Veränderungen

an der Desoxyribose und/oder den Basen für die Strahlensensibilisierung nach BU-Einbau verantwortlich sind.

Den Damen R. MAUSER und R. WALSER danken wir für ihre wertvolle technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente sowie beim Schreiben des Manuskripts.