

Wirkung von γ - und β -Strahlung auf Hefe und deren Nucleinsäurevorstufen

Von

H. Altmann und G. Stehlik

Aus dem Institut für Biologie und Landwirtschaft
des Reaktorzentrums Seibersdorf *

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 14. Dezember 1967)

Das Überleben der Hefezellen nach β - und γ -Bestrahlung wurde durch das Koloniebildungsvermögen ermittelt; bei gleicher Dosis und Dosisleistung wurden nur schwach unterschiedliche Effekte festgestellt. Das Nucleotidverteilungsmuster zeigte nach γ -Bestrahlung mit 300 000 rad größere quantitative Änderungen als nach β -Bestrahlung. Die Konzentrationen an Nucleosidtriphosphaten war nach γ -Bestrahlung stärker herabgesetzt.

Einleitung und Problemstellung

In Zusammenhang mit Problemen der Lebensmittelbestrahlung war es wertvoll, die Wirkung der oben genannten Strahlenarten auf Hefezellen festzustellen. Bei Einwirkung auf Fruchtsäfte zeigte die β -Bestrahlung geringere organoleptische Veränderungen als γ -Strahlung¹. Allerdings erfolgte die β -Bestrahlung bei einer höheren Dosisleistung.

In der vorliegenden Untersuchung sollte bei gleicher Dosisleistung die Wirkung beider Strahlenarten auf Hefe näher geprüft werden. In früheren Arbeiten^{2, 3} konnten wir bei γ -Bestrahlung, allerdings mit wesentlich geringerer Dosisrate, eine Verminderung der Nucleosidtriphosphate bei gleichzeitigem Anstieg der Monophosphate feststellen.

* Leiter: Prof. Dr. K. Kaindl.

¹ H. Lüthi, persönliche Mitteilung.

² G. Stehlik und H. Altmann, Mh. Chem. **99**, 359 (1968).

³ G. Stehlik, H. Altmann und K. Kaindl, SGAE BL. 22/1967, 1—17.

Dies könnte mit einer Hemmung der oxydativen Phosphorylierung, einem Vorgang, der für Hefen bei etwa 400 000 rad wirksam wird⁴, ebenso im Zusammenhang stehen, wie mit einer Hemmung des Glucoseabbaues⁵.

Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial diente Bäckerhefe der Brauerei Schwechat, die in halbsynthetischem Nährmedium⁶ gezogen und aus der logarithmischen Phase geerntet wurde. Nach Abzentrifugieren mit Hilfe einer Kühlzentrifuge (4°C) wurde die Hefe zweimal mit 0,14m-Mannitlösung gewaschen und schließlich im gleichen Volumen Mannitlösung suspendiert. Ein kleiner Teil dieser Suspension diente zur Ermittlung der Überlebenskurven mit Hilfe des Kochschen Plattenverfahrens unter Verwendung des halbsynthetischen Nährbodens⁶. Die restliche Suspension wurde in drei gleiche Teile geteilt.

Während zwei dieser Proben der β - bzw. γ -Bestrahlung mit je 300 000 rad bei 4°C unterworfen wurden, blieb die Kontrollprobe für den gleichen Zeitraum bei 4°C gelagert. Als β -Quelle diente die in Abb. 1 skizzierte ⁹⁰Sr-Quelle „IBIatron“⁷, die eine Dosisleistung von 900 krad/h hatte. Um ein Sedimentieren der Zellen zu vermeiden, wurde die Hefesuspension während der β -Bestrahlung in einem abgeschlossenen System mittels einer Schlauchquetschpumpe im Umlauf gehalten. Die Dosimetrie dieser ⁹⁰Sr- und ⁹⁰Y-Mischstrahlung erfolgte nach *Suschny*⁸.

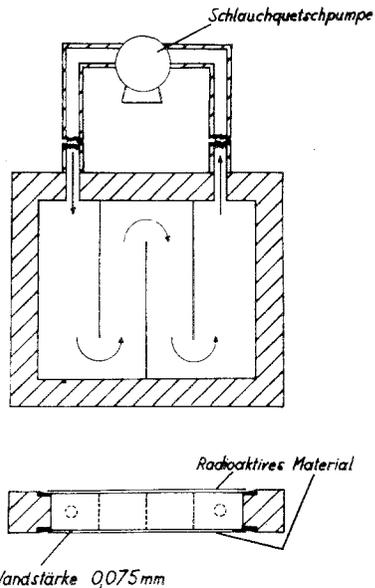


Abb. 1. β -Strahlenkammer IBIatron mit Schlauchquetschpumpe

⁴ H. Fritz-Niggli, Radiol. clin. [Basel] **32**, 465 (1963).

⁵ E. Pfisterer, Dissertation, Hochschule für Bodenkultur, Wien 1967.

⁶ G. Stehlik und K. Kaindl, STI/PUB/127, IAEA, Vienna (1966), 299.

⁷ T. Cless-Bernert, III. Internat. Conf. on peaceful uses of atomic energy, Geneva 8.—20. Aug. 1955, Nr. 862.

⁸ O. Suschny, H. Frittm und H. Eisenlohr, „Solid state and chemical radiation dosimetry in medicine and biology“. Internat. Atomic Energy Agency, Vienna 1967, 317.

Tabelle 1. Identifizierung der in Abb. 2—4 aufgetrennten Nucleotide

Fraktion in Abb. 3—5	Nucleotid	Abkürzung	Laufmittel	R_f -Werte			
				Standard	Kontr. (Abb. 2)	β -Bestr. γ -Bestr. (Abb. 3) (Abb. 4)	
A	Cytidin-5'-monophosphat	<i>CMP</i>	Isobuttersäure— NH ₄ OH (conc.)— H ₂ O 66 : 1 : 33 pH = 3,7	0,35	0,38	0,37	0,36
B	Diphosphoryridinnucleotid	<i>DPN</i>		0,34	0,37	0,36	0,37
C	Derivate des Cytidin-5'- diphosphats	<i>CDP</i> -deriv.		0,13	0,13	0,13	0,13
D	Adenosin-5'-monophosphat	<i>AMP</i>		0,44	0,43	0,44	0,42
E	Guanosin-5'-monophosphat	<i>GMP</i>		0,16	0,17	0,17	0,16
F	Uridin-5'-monophosphat	<i>UMP</i>		0,26	0,25	0,24	0,24
G	Adenosin-5'-diphosphat	<i>ADP</i>		0,33	0,32	0,34	0,32
H	Guanosin-5'-diphosphatmannose	<i>GDPM</i>		0,13	0,14	0,14	0,13
K	Uridin-5'-diphosphat-N-acetyl- glycosamin	<i>UDPA</i>		0,11	0,11	0,11	0,10
L	Uridin-5'-diphosphathexosen	<i>UDPH</i>		0,13	0,11	0,11	0,10
M	Guanosin-5'-diphosphat	<i>GDP</i>		0,14	0,15	0,14	0,14
N	Cytidin-5'-triphosphat	<i>CTP</i>		0,17			
	Adenosin-5'-triphosphat	<i>ATP</i>		0,19	0,19	0,19	0,18
O	Guanosin-5'-triphosphat	<i>GTP</i>	0,63— 0,80	0,61— 0,80	0,60— 0,78	0,58— 0,78	
	Uridin-5'-triphosphat	<i>UTP</i>					
			97% 0,1M-Phos- phate, pH 6,8 plus 600 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ 3% Propanol				

Die γ -Bestrahlung erfolgte mit ^{60}Co in einer „Gammacell 220“, ebenfalls mit einer Dosisleistung von 900 000 rad/h, ermittelt durch *Fricke*-Dosimetrie⁹.

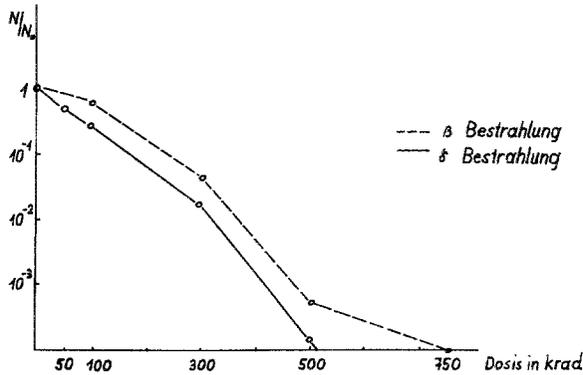


Abb. 2. Überlebenskurven von Hefe nach β - bzw. γ -Bestrahlung (Hefeausgangskonzentration ca. 10^6 Zellen/ml)

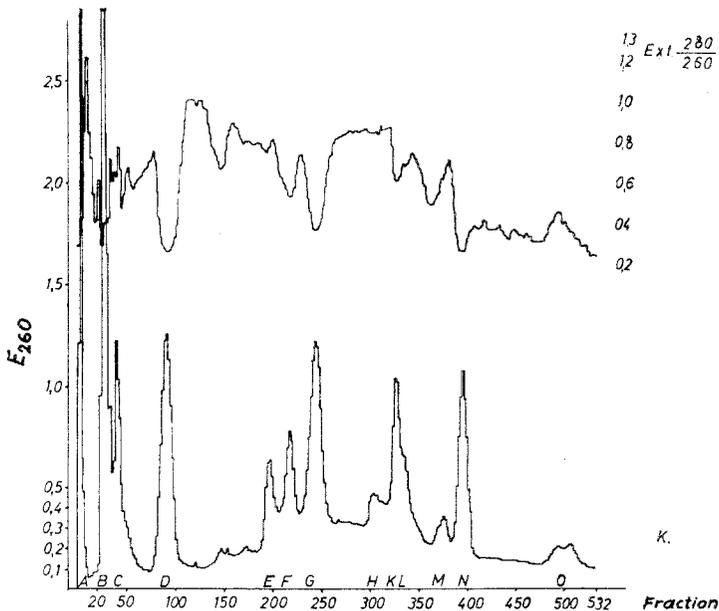


Abb. 3. Auftrennung der freien Nucleotide aus Hefe an DOWEX-1 \times 10 (200—400 mesh), Formiatform (1×42 cm), 5,5 ml-Fractionen, linearer Gradient von HCOOH in H_2O bzw. HCOONH_4 in HCOOH (Charakterisierung der einzelnen Peaks in Tab. 1)

⁹ H. Fricke und S. Morse, Amer. J. Roentg. **18**, 426 (1927); Physic. Rev. **31**, 117 (1928); H. Fricke und E. J. Hart, J. chem. Physics **3**, 60 (1935).

Die Extraktion der freien Nucleotide erfolgte mit 0,6*n*-HClO₄, wie bereits früher beschrieben². Aufgetrennt wurden sie auf formiatbeladenem DOWEX 1×10 (200—400 mesh; 1 cm×42 cm). Zur Elution von der Säule diente ein linearer Gradient von HCOOH in H₂O bzw. von HCOONH₄ in HCOOH¹⁰.

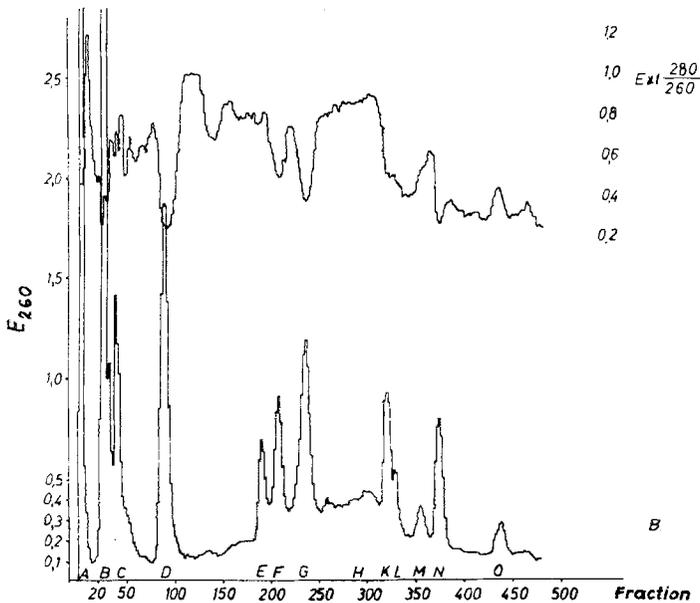


Abb. 4. Auftrennung der freien Nucleotide aus Hefe nach β -Bestrahlung (300 000 rad ⁹⁰Sr) an DOWEX-1×10 (200—400 mesh), Formiatform (1×42 cm), 5,5 ml-Fractionen, linearer Gradient von HCOOH in H₂O bzw. HCOONH₄ in HCOOH (Charakterisierung der einzelnen Peaks in Tab. 1)

Mit Hilfe von LKB-Fraktionskollektoren wurden Fractionen zu je 5,5 ml aufgefangen und deren Extinktionen bei 260 und 280 nm in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke mit einem PMQ II Spektralphotometer bestimmt. Zur Identifizierung der einzelnen Peaks diente das Extinktionsverhältnis für 280 und 260 nm. Für eine zusätzliche papierchromatographische Auftrennung wurden die Fractionen für je einen Peak vereinigt. Um eine Abtrennung vom Elutionsmittel zu erreichen, wurden die Nucleotide an aktiviertem Norit adsorbiert und mit äthanol. NH₄OH nach Bergkvist¹¹ eluiert.

Nach Einengen dieser Eluate mittels eines Rotationsverdampfers bei 4° C wurden die Nucleotide in den in Tab. 1 angegebenen Laufmitteln

¹⁰ G. Stehlik, *J. Chromatogr.* **34**, 128 (1968).

¹¹ R. Bergkvist, *Acta chem. Scand.* **10**, 1303 (1956).

auf S & S 2043 bM chromatographiert. R_f -Werte der in den Abb. 2—4 aufgetrennten Nucleotide: Tab. 1.

Ergebnisse

Die LET-Werte (linear energy transfer) haben für Hefe im Bereich von 0,5 bis etwa 25 keV/ μ eine RBW (relative biologische Wirksamkeit) von etwas über Eins, jedoch steigt die RBW für höhere LET-Werte stark an¹².

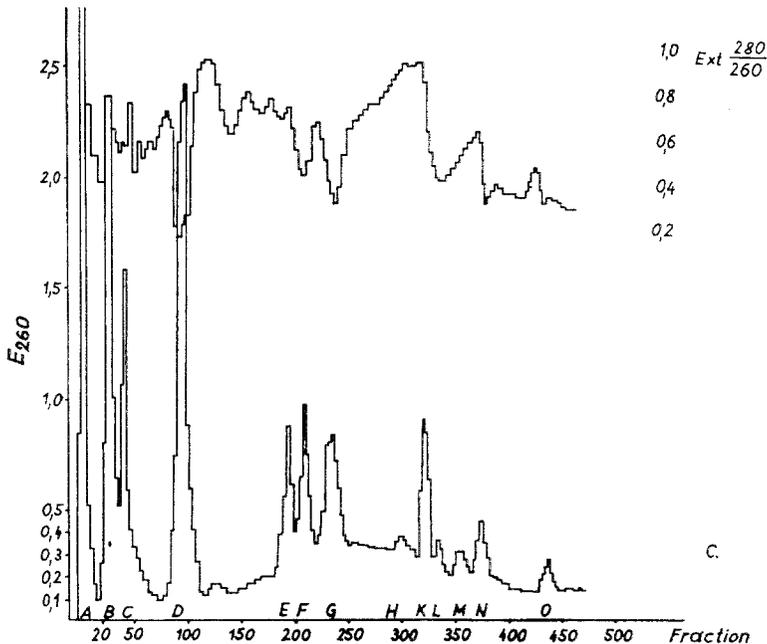


Abb. 5. Auftrennung der freien Nucleotide aus Hefe nach γ -Bestrahlung (300 000 rad ^{60}Co) an DOWEX-1 \times 10 (200—400 mesh), Formiatform (1 \times 42 cm), 5,5 ml-Fractionen, linearer Gradient von HCOOH in H_2O bzw. HCOONH_4 in HCOOH (Charakterisierung der einzelnen Peaks in Tab. 1)

Für die ^{60}Co - γ -Strahlung errechnet sich ein LET-Wert von 0,42 keV/ μ . Da in der von uns verwendeten β -Quelle der Anteil an ^{90}Sr -Strahlung, im Vergleich zu ^{90}Y -Strahlung, durch Selbstabsorption im Sr_2TiO_4 und durch die Stahlabschirmung relativ klein ist, kann man in erster Annäherung den Wert der ^{90}Y -Strahlung mit 0,20 keV/ μ annehmen.

Aus der Abb. 2 kann man erkennen, daß β - und γ -Bestrahlung eine ähnliche Auswirkung auf das Überleben der Hefezellen besitzt. Das

¹² R. E. Zirkle in A. Hollaender, „Radiation Biology“, McGraw-Hill Book 1954, S. 321.

Koloniebildungsvermögen zeigt nur eine geringfügige Abweichung zu kleineren RBW-Werten für die β -Bestrahlung.

In den Abb. 3, 4 und 5 ist die Auftrennung der freien Nucleotide aus der Kontrollprobe, der Hefe nach β -Bestrahlung und derjenigen nach γ -Bestrahlung wiedergegeben. Die Nucleosidmonophosphate erscheinen in den bestrahlten Proben vermehrt auf. Am deutlichsten ist dieser Unterschied bei *AMP* erkennbar. Die Nucleosiddiphosphate sind bei bestrahlten Proben und der Kontrolle in etwa gleicher Konzentration vorhanden, während die Nucleosidtriphosphate, und hier auch wieder besonders das *ATP*, etwas vermindert auftreten.

Das Nucleotidverteilungsmuster ist nach β - und γ -Bestrahlung annähernd gleich, nur treten die oben beschriebenen Effekte für die γ -Bestrahlung deutlicher hervor. Der stärkste Unterschied läßt sich in einem stark reduzierten *ADP*- und *ATP*-Gehalt nach γ -Bestrahlung erkennen.

Für die finanzielle Unterstützung zur Durchführung dieser Arbeiten danken wir dem Bundesministerium für Handel, Gewerbe und Industrie, Sektion IV, Abteilung 30.

Für Hilfe bei der technischen Durchführung der Arbeiten danken wir Herrn A. Topaloglou.