

Untersuchungen über die Strahlenwirkung auf die *DNS*-Synthese in synchronen Chlorellazellen

Von

H. Altmann, F. Fetter, E. Pfisterer, A. v. Szilvinyi und K. Kaindl

Aus dem Institut für Biologie und Landwirtschaft des Reaktorzentrumms
Seibersdorf

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 7. Februar 1968)

Im Entwicklungszyclus der Chlorella wird ein Stadium geringster Strahlenresistenz knapp vor dem Einsetzen der *DNS*-Synthese durchlaufen. Während der S-Phase steigt die Resistenz an und erreicht ihren Höhepunkt nach Abschluß der *DNS*-Synthese.

Bei einer akuten Gammabestrahlung mit 10 krad konnte eine Stimulierung der *DNS*-Synthese beobachtet werden. Hingegen war bei einer Strahlendosis, welche das Koloniebildungsvermögen zu 50% unterdrückte, eine schwache Hemmung der Synthese bemerkbar. Erst durch 40 krad (etwa LD₉₀) wurde die *DNS*-Synthese stark unterdrückt.

Mögliche Erklärungen für die Schwankungen der Strahlensensitivität im Ablauf des Cyclus werden diskutiert.

The variation in the radioresistance of Chlorella cells during their life cycle has been compared with the *DNA* synthesis. The most sensitive stage was immediately before the beginning of *DNA* synthesis and a rapid rise in resistance developed during the S phase. The most resistant stage occurs when *DNA* synthesis is completed. After irradiation with 10 krads a stimulation of *DNA* synthesis was observed. After a dose, sufficient to reduce colony-forming ability by 50%, there was only a small reduction in *DNA* synthesis. At 40 krad (LD₉₀) *DNA* synthesis was strongly inhibited. Possible mechanisms for the variation in radiation sensitivity during the life cycle are discussed.

Viele Untersuchungen befassen sich mit der Verzögerung oder Unterdrückung der *DNS*-Synthese durch ionisierende Strahlen¹⁻⁵. *Euler* und *Hevesy*⁶ beobachteten als erste die strahlenbedingte Hemmung des Einbaues von ³²P in die *DNS*. Die gefundene Unterdrückung der *DNS*-Synthese wurde mit der für diese Synthese notwendigen Induktion von Enzymen in Zusammenhang gebracht⁷. Zu diesen Enzymen zählen vor allem die *dCMP*-Desaminase, die Thymidin- und Thymidilat-kinasen, *TMP*-Synthetasen und *DNS*-Polymerasen, die alle als „sensitive“ Enzyme bekannt sind⁸. Charakteristika der sensitiven Enzyme sind Instabilität und Empfindlichkeit gegenüber physiologischen Veränderungen der Zelle sowie ein hoher metabolischer Umsatz. *Bollum* konnte allerdings zeigen, daß auch bei unterdrückter *DNS*-Synthese *DNS*-Polymerasen und Thymidin-Kinasen weiterhin synthetisiert werden⁹. Diese Enzyme sollen relativ strahlenresistent sein und erst bei sehr hohen Dosen inaktiviert werden¹⁰.

Auch direkte strahlenbedingte Veränderungen am *DNS*-Molekül¹¹ sowie im Vorstufen-Pool der Zelle¹² können zu Schädigungen führen. Allerdings scheint die „primer-Aktivität“ der *DNS* durch geringe Strahlendosen nicht wesentlich verändert zu werden¹³.

Es liegen andererseits auch Arbeiten vor, in denen kein strahlenbedingter Einfluß auf die *DNS*-Synthese festgestellt wurde¹⁴. Allerdings zeigte sich bei diesen Versuchen mit synchronen tierischen Gewebekulturen, daß eine strahlenbedingte Blockierung unmittelbar vor der Mitose zu einer Störung im Entwicklungszyklus führt¹⁴. Es wurde daraus geschlossen, daß gehemmte *DNS*-Synthesen auf sekundäre Effekte, die auf strahlenbedingten mitotischen Hemmungen beruhen, zurückzuführen

¹ *B. Posner* und *A. H. Sparrow*, Radiat. Bot. **4**, 253 (1964).

² *D. C. Shepard*, Exper. Cell Res. **38**, 570 (1965).

³ *A. M. Kuzin* und *A. A. Vainson*, Radiobiologiya **5**, 785 (1965).

⁴ *R. E. Libizon* und *I. A. Tsereteva*, Radiobiologiya **6**, 1 (1966).

⁵ *L. O. Chang*, *S. S. Williams* und *W. B. Looney*, Nature **211**, 5046 (1966).

⁶ *G. Hevesy* und *H. Euler*, K. danske Vidensk. Selsk. skr. Biol. Medd. **17**, 8 (1942).

⁷ *S. Okada* und *I. H. Hempelmann*, Internat. J. Radiat. Biol. **1**, 305 (1959).

⁸ *J. S. Roth*, Life Sci. **3**, 1145 (1964).

⁹ *F. J. Bollum*, *J. W. Andregg*, *A. B. McElya* und *U. R. van Potter*, Cancer Res. **20**, 138 (1960).

¹⁰ *E. R. Walwich* und *R. K. Main*, Biochim. Biophys. Acta **55**, 225 (1962).

¹¹ *J. L. Van Lancker*, Biochim. Biophys. Acta **45**, 57 (1960).

¹² *R. A. McGrath*, *R. W. Williams* und *R. B. Seltow*, Internat. J. Radiat. Biol. **8**, 4 (1964).

¹³ *Ch. Wheeler* und *S. Okada*, Internat. J. Radiat. Biol. **3**, 23 (1961).

¹⁴ *G. F. Whitmore*, *C. P. Stanners* und *J. E. Till*, Biochim. Biophys. Acta **47**, 66 (1961).

sind. Aber auch eine gewisse Stimulierung der *DNS*-Synthese nach Einwirkung geringer Strahlendosen konnte nachgewiesen werden¹⁵.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die strahlenbedingte Beeinflussung der *DNS*-Synthese nach drei verschiedenen Methoden überprüft.

Im ersten Versuch wurde zu verschiedenen Zeitpunkten des Cyclus bestrahlten und unbestrahlten Chlorellazellen ³²P angeboten.

In der zweiten Versuchsserie wurde die Chlorella gegen Ende der G₁-Phase mit verschiedenen Dosen bestrahlt; anschließend ließ man sie zu verschiedenen Zeitpunkten der S-Phase ¹⁴C-Thymidin kurzzeitig einbauen¹⁶.

Drittens wurde zum Zeitpunkt der maximalen *DNS*-Synthese in bestrahlte und unbestrahlte Chlorellazellen ¹⁴C-Thymidin kurzzeitig eingebaut; die Nukleinsäuren wurden extrahiert und mit Hilfe einer modifizierten *MAK*-Methode* aufgetrennt¹⁷.

Die in diesen Versuchsreihen erhaltenen Ergebnisse werden mit der Strahlensensitivität während der einzelnen Stadien in Zusammenhang gebracht.

Durchführung der Untersuchungen

Bei unseren Untersuchungen verwendeten wir die einzellige Grünalge *Chlorella pyrenoidosa*, Stamm Nr. 211-8b, der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen. Das für die Untersuchungen notwendige synchrone Zellmaterial wurde einer automatischen Anlage entnommen¹⁸.

Einbauversuche mit ³²P

Während des Entwicklungszyclus der Chlorella wurde 8mal in Intervallen von je 4 Stdn. 200 ml Zellsuspension (Zellzahl 1×10^7 Zellen/cm³) von der Züchtungsanlage abgenommen und jede der 8 Proben in 2 aliquote Teile geteilt.

Ein Teil wurde jeweils in einer 600 Ci ⁶⁰Co-Gamma-Zelle (60 krad/Stde.) mit 40 krad bestrahlt. Es ist das die Dosis, welche im resistentesten Punkt des Entwicklungszyclus der LD₉₀ entspricht. Der andere Teil (Kontrolle) wurde inzwischen bei gleicher Temperatur im Dunkeln gehalten.

Nach der Bestrahlung wurde die Inkubation mit ³²P durchgeführt: Dazu wurden die bestrahlte Probe und die Kontrolle mit je 4 μ Ci ³²P (1 mCi/mM) versetzt und 30 Min. bei 30° C gerührt.

Das markierte Algenmaterial wurde 2mal mit Nährlösung gewaschen und die *DNS* sodann nach einer modifizierten Methode von *Schmidt* und *Tannhauser* mit Kochsalzlösung extrahiert¹⁹. Nach alkalischer Hydrolyse

* Chromatographie auf einer Methylalbumin—Kieselgur-Säule.

¹⁵ R. E. Rasmussen und R. B. Painter, *J. Cell Biol.* **29**, 11 (1966).

¹⁶ F. Fetter und H. Altmann, in Ausarbeitung.

¹⁷ H. Altmann, I. Dolejs und F. Fetter, *Analyt. Biochem.* **22**, 477 (1967).

¹⁸ F. Fetter und T. Gumpelmayer, *Die Bodenkultur* **18**, 4 (1967).

¹⁹ E. Harbers, *Die Nukleinsäuren*, Thieme, Stuttgart 1964.

und Alkoholfällung wurde das mit Äthanol gewaschene *DNS*-Präzipitat auf Aluminiumschälchen aufgedampft und die ^{32}P -Aktivität im Methandurchflußzähler gemessen.

In der folgenden Abbildung ist die durch den ^{32}P -Einbau charakterisierte *DNS*-Synthese in Korrelation zur Strahlenresistenz innerhalb des Zellcyclus dargestellt.

Bestimmung der DNS-Synthese und deren Unterdrückung oder Stimulierung durch Gamma-Strahlung, gemessen durch Einbau von ^{14}C -Thymidin

2000 ml der Suspension synchroner Chlorellazellen wurde in der 8. Stde. des Cyclus von der Züchtungsanlage abgenommen und in 4 gleiche Teile geteilt. Ein Teil wurde als Kontrolle bei gleicher Temperatur im Dunkeln gehalten, während die anderen 3 Teile mit je einer der folgenden Gamma-Dosen bestrahlt wurden:

1. Teil: 10 krad.
2. Teil: 20 krad.
3. Teil: 35 krad.

Die drei unterschiedlich bestrahlten Proben und die Kontrolle wurden hierauf unter sterilen Bedingungen in 4 Züchtungssäulen gebracht. Die Kulturen wurden nun unter den bekannten Bedingungen weiter wachsen gelassen¹⁸.

Ab der 11. Stde. des Entwicklungszyclus wurden von jeder Säule in Abständen von 3 Stdn. Proben genommen (100 ml, 7×10^6 Zellen/ml) und mit $4 \mu\text{Ci}$ ^{14}C -Thymidin (Spezif. Akt. 25—30 mCi/mMol) 30 Min. bei 30°C unter Rühren inkubiert. Nach der Inkubation wurde das markierte Algenmaterial abzentrifugiert, 2mal mit Nährlösung gewaschen und zur Entfernung der niedermolekularen Substanzen mit 60proz. Alkohol behandelt. Nach Zentrifugation wurden die Zellrückstände zur Entfernung der Farbstoffe und Lipide in einem Alkohol—Äther-Gemisch (V/V 3:1) aufgenommen, gerührt und nach Zentrifugation mit reinem Äther erschöpfend extrahiert. Die Gewinnung der Nucleinsäuren erfolgte durch 20 Min. langes Erhitzen der Zellrückstände auf 90°C mit 5proz. Trichloressigsäure (*TCE*), wobei die Nucleinsäuren in Lösung gebracht wurden. Anschließend wurde heiß abzentrifugiert und der Rückstand verworfen.

Vor der Messung der Aktivitäten wurde die *TCE* durch oftmaliges Ausschütteln mit Äther entfernt. Danach wurden die Proben auf Aluminiumschälchen am Sandbad zur Trockene eingedampft und die Aktivitäten im Methandurchflußzähler gemessen.

In der folgenden Abbildung ist die ^{14}C -Aktivität nach Einbau des ^{14}C -Thymidin in die *DNS* der Chlorella nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen wiedergegeben.

Einbau von ^{14}C -Thymidin in bestrahlte und unbestrahlte Chlorellazellen in der 16. Stunde des Entwicklungszyclus

2×3 l Suspension synchronen Zellmaterials mit einer Zellzahl von 1×10^7 /ml wurden zur 16. Stunde des 28-Stunden-Cyclus der Züchtungsanlage entnommen. Die Algen wurden sodann in einer 6 l-MSE-Kühlzentrifuge von der Nährlösung abzentrifugiert, 1mal mit 0,14m-Mannit-Lösung gewaschen und in je 100 ml dieser Lösung aufgenommen.

Eine der beiden Proben wurde mit der LD_{90} für *Chlorella* (in der resistentesten Phase etwa 40 krad) in einer Gamma-Zelle mit einer Dosisleistung von etwa 60 krad/Stde. bestrahlt. Die Kontrolle wurde inzwischen bei gleicher Temperatur im Dunkeln gehalten. Sodann wurden bestrahlte Probe und Kontrolle mit je 200 ml Nährlösung, in welcher je 25 μCi ^{14}C -Thymidin (Spezif. Akt. 25–30 mCi/mMol) gelöst waren, versetzt und im Klimaraum unter dauerndem Rühren bei 30° C 30 Min. inkubiert.

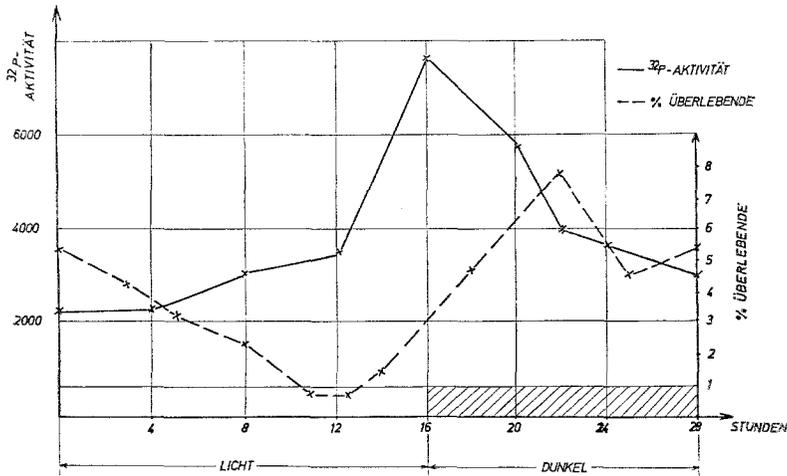


Abb. 1. Zusammenhang zwischen Strahlenresistenz und *DNS*-Synthese innerhalb des Entwicklungszyklus

Nach der Inkubation wurden die Proben abzentrifugiert, das markierte Algenmaterial 2mal mit 0,05*m*-*Tris*-Puffer, pH 6,7, gewaschen, sodann das Feuchtgewicht des Materials bestimmt und getrennt aufgearbeitet. Die weitere Aufarbeitung der *Chlorella* sowie die Extraktion der Nukleinsäuren wurde nach einer von *Richter* und *Senger*²⁰ speziell für Grünalgen ausgearbeiteten Methode, die sich der Phenolspaltung bedient, durchgeführt.

Die isolierten Nukleinsäuren wurden auf einer modifizierten *MAK*-Säule aufgetrennt¹⁷.

Die Elution von der Säule wurde mit einer peristaltischen Pumpe auf 5 ml/7,5 Min. eingeregelt. Aufgefangen wurden die einzelnen Fraktionen mit Hilfe eines automatischen *LKB*-Fraktionskollektors. Die Extinktion der einzelnen Fraktionen wurde bei 260 nm mit einem Spektralphotometer (Zeiss PM Q II) gemessen. Zur Bestimmung der ^{14}C -Aktivität als Maß für den Einbau von Thymidin in die *DNS* wurden je 3 ml der einzelnen Fraktionen auf Aluminiumschälchen aufgedampft und im Methandurchflußzähler (FH 49, Frieseke & Hoepfner) gemessen.

In Abb. 3 ist die Unterdrückung der *DNS*-Synthese nach Bestrahlung mit 40 krad zum Zeitpunkt der maximalen *DNS*-Synthese dargestellt.

²⁰ G. Richter und H. Senger, *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 502 (1964).

Diskussion der Ergebnisse

Abb. 1 zeigt, daß der sensitivste Punkt im Cyclus mit dem frühen Beginn der *DNS*-Synthese zusammenfällt oder knapp vor deren Beginn liegt. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen *Teresima* und *Tolmach*²¹ an Gewebekulturzellen. Diese Autoren stellten die Kurve der *DNS*-Synthese der Strahlenempfindlichkeit synchroner HeLa Zellen gegenüber und fan-

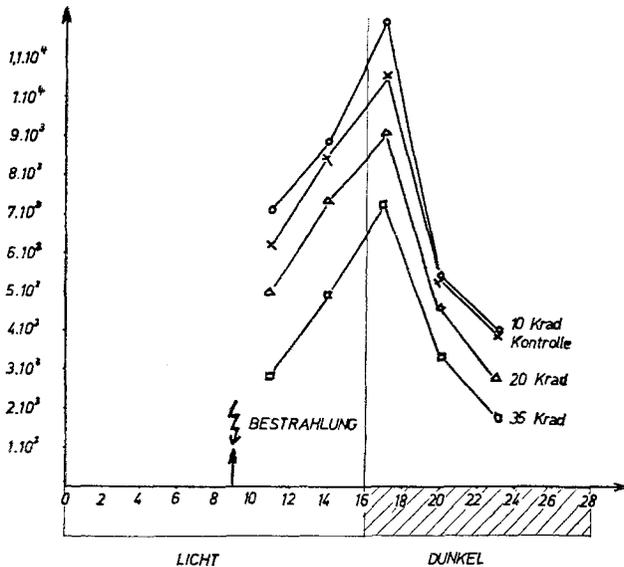


Abb. 2. Hemmung bzw. Stimulation der *DNS*-Synthese nach Bestrahlung, gemessen durch ¹⁴C-Thymidineinbau

den ein Minimum an Überlebenden zu Beginn der S-Phase. Diese Ergebnisse decken sich auch mit denjenigen, die bei Versuchen mit synchronen Hefezellen gefunden worden waren. (*M. Putz* und *H. Altmann*, in Ausarbeitung.)

Im Verlauf der *DNS*-Synthese konnten wir ein starkes Ansteigen der Strahlenresistenz der Zellen beobachten. In der 22. Stunde des Cyclus — im Zeitpunkt höchster Resistenz — ist die *DNS*-Synthese, charakterisiert durch den ³²P-Einbau, schon im Abklingen, aber noch nachweisbar.

Da bei der hier beschriebenen Methode eine Trennung von extrahierten Nukleinsäuren und Polyphosphaten nicht exakt durchgeführt werden kann, wurde in einem anderen Versuch die Nukleinsäurevorstufe ¹⁴C-Thymidin eingebaut (Abb. 2).

²¹ *T. Teresima* und *L. J. Tolmach*, *Biophys. J.* **3**, 11 (1963).

Es konnten hier in bezug auf Beginn und Maximum der *DNS*-Synthese mit der ersten Untersuchung übereinstimmende Ergebnisse erhalten werden. Auffallend ist vor allem die im zweiten Versuch festgestellte Stimulierung bei einer Gamma-Bestrahlung von 10 krad um 10% der

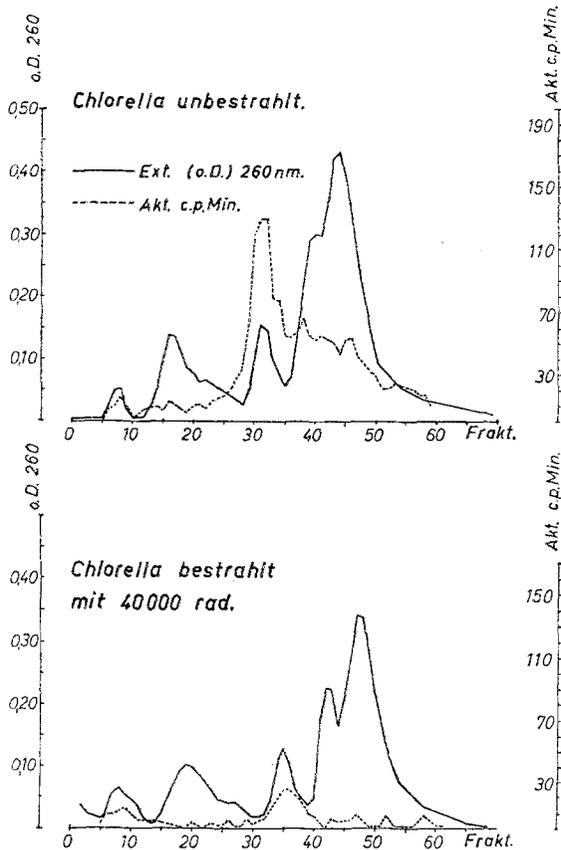


Abb. 3. Einbau von ^{14}C -Thymidin in die *DNS* aus bestrahlten und unbestrahlten Chlorellazellen während der 16. Stunde des Zellezyclus

Kontrolle. Bei 20 krad kommt es bereits zu einer Unterdrückung auf 84% und bei 35 krad auf 58% des Kontrollwertes.

Da die Induktion der *DNS*-Synthese ein lichtabhängiger Prozeß ist²², bei dem vor allem SH-gruppenhaltige Verbindungen eine bedeutende Rolle spielen, scheint vor der Bestrahlung (Abb. 2) in der 9. Stunde des Cyclus entweder die Induktion der Synthese schon erfolgt zu sein, oder aber die Zeitpunkte für die Probenahme lagen zu weit auseinander, als daß man

²² H. Senger und H. I. Bishop, *Plant and Cell Physiol.* 7, 441 (1966).

bei der Stimulierung bzw. Hemmung der *DNS*-Synthese eine zeitliche Verschiebung derselben hätte feststellen können.

Die Ursachen für die Stimulierung und Hemmung sind noch weitgehend ungeklärt. Die Annahme, daß die für die *DNS*-Synthese notwendigen Enzyme erst knapp vor deren Beginn gebildet werden²³ und diese Neusynthese durch die Strahlung unterdrückt wird, stellt die Grundlage für mögliche Hemmechanismen dar. Dagegen spricht allerdings, daß bei 10 krad eine deutliche Stimulierung erfolgt, die allgemein mit Enzymaktivitätssteigerungen nach der Bestrahlung erklärt wird. Es sollten also zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits die für die *DNS*-Synthese notwendigen Enzyme vorhanden gewesen sein.

Die Auftrennung des Nukleinsäuregemisches aus *Chlorella* über *MAK*-Säulen ergab keinen wesentlichen Unterschied zu den Ergebnissen, welche bei den vorher durchgeführten Untersuchungen erhalten wurden (Abb. 3). Obwohl durch die angewendete Strahlendosis von 40 krad etwa 95% der Zellen am Koloniebildungsvermögen gehindert wurden²⁴, konnte dennoch eine *DNS*-Synthese, wenn auch stark unterdrückt, festgestellt werden.

²³ R. A. Johnson und R. Schmidt, *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 140 (1966).

²⁴ E. Pfisterer, *Studia Biophys.* **6**, 73 (1968).