

UV-Empfindlichkeit von λ -Phagen mit variablem Bromuracil-Gehalt

UV-Sensitivity of λ -Phages with Various BU-Contents

Friedrich Mönkehaus

Institut für Strahlenbiologie, Universität Münster

(Z. Naturforsch. **29 c**, 289—293 [1974]; eingegangen am 14. Dezember 1973/19. Februar 1974)

UV-Sensitivity, λ -Phages, Bromouracil, Energy-transfer

Heat induction of *E. coli* CR 34 (λ cI₈₅₇)/ λ growing in media with varying bromouracil (BU)-contents yielded λ -phages with different amounts of BU in their DNA-strands. The percentage substitution of thymine was determined by buoyant density measurements in a CsCl-density gradient. After irradiation of the phages with long wavelength UV (302/313 nm) and short wavelength UV (254 nm) the sensitivity (loss of infectivity) was determined as a function of the degree of BU-substitution. It was found that after irradiation with long wavelength UV the cross section is proportional to the percentage BU-substitution, whereas after irradiation with short wavelength UV it is not. The results can be explained by assuming energy transfer from the four DNA-bases to the BU.

I. Einleitung

Der Einbau von 5-Bromuracil (BU) in Nukleinsäuren bewirkt eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit gegenüber ionisierender und UV-Strahlung^{1, 2}, wobei die Sensibilisierung mit zunehmendem BU-Gehalt der DNA ansteigt³. Diese erhöhte Strahlenempfindlichkeit wurde durch den erhöhten Energieabsorptionsquerschnitt des Br-Atoms, durch Radikalreaktionen, die zum Einzelstrangbruch führen⁴, und durch ein in Anwesenheit von BU vermindert wirksames Reparatursystem erklärt (siehe z. B. Übersichtsartikel von Kaplan⁵).

Neuere Untersuchungen an DNA und ähnlichen Modellsystemen, in denen Thymin ganz oder teilweise durch BU ersetzt wurde, deuten darauf hin, daß absorbierte Strahlenenergie vorzugsweise zum BU wandert. Die Beobachtung der Lumineszenzparameter in DNA bzw. Purin-Pyrimidin-Kristallkomplexen führte zu dem Schluß, daß nach ionisierender Bestrahlung eine Energieübertragung über mindestens 200 Basenpaare hinweg infolge Exciton- oder Ladungstransport stattfindet^{6, 7}. Messung der Br⁻-Ausbeute nach Bestrahlung und Pulsradiolyse von thyminbromuracilhaltigen Lösungen ergaben eindeutig einen Ladungstransport zum BU⁸, der möglicherweise mitverantwortlich für die BU-Sensibilisierung ist. Ein analoger Energietransport zum BU konnte nach UV-Bestrahlung (254 nm) durch Messung der Bruchraten in DNA mit varia-

blem BU-Gehalt festgestellt werden⁹. In allen geschilderten Experimenten wurde der Effekt, der bei vollständiger Substitution des Thymin durch BU eintritt, schon bei wesentlich geringerem Substitutionsgrad gefunden.

Parallel zu diesen physico-chemischen Prozessen sollten biologische Effekte in Abhängigkeit vom BU-Substitutionsgrad nachweisbar sein, die ebenfalls den Schluß auf Energietransport in der DNA-Kette nahe legen. In dieser Arbeit werden Resultate geschildert, die nach UV-Bestrahlung von λ -Phagen erhalten wurden. Bestimmt wurde der Verlust der Infektiosität in Abhängigkeit der UV-Dosis und des BU-Substitutionsgrades. Die Bestrahlung erfolgte einmal mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm), zum anderen mit langwelligem UV-Licht (302/313 nm). Dabei sollte untersucht werden, ob die unterschiedliche Photochemie auch zu verschiedenen Energietransportprozessen führt.

II. Materialien und Methoden

1. Phagen- und Bakterienstämme

λ cI₈₅₇ trägt eine cI-Mutation, die eine Induktion oberhalb 38°C verursacht¹⁰.

CR 34, eine Thymin-Mangelmutante¹¹, wurde mit λ cI₈₅₇ lysogenisiert.

CR 34 (λ cI₈₅₇)/ λ diente zur Produktion von λ cI₈₅₇ mit variablem BU-Gehalt.

C 600 wurde als Indikatorstamm verwendet¹².

2. Medien und Puffer

TB-Medium: 1% Difco-Tryptone; 0,5% NaCl; 0,01 M MgSO₄; 5 µg/ml Vitamin B₁; 0,2% Maltose.

Sonderdruckanforderungen an Dr. F. Mönkehaus, Institut für Strahlenbiologie, Universität Münster, D-4400 Münster, Hittorfstr. 17.

Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.



A-Medium: 0,7% Na_2HPO_4 ; 0,3% KH_2PO_4 ; 0,1% NH_4Cl ; 0,05% NaCl ; $2 \cdot 10^{-2}$ M MgSO_4 ; $3 \cdot 10^{-6}$ M FeCl_3 ; 0,6% Casamino acids; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Vitamin B₁; 0,7% Glucose.

λ -Puffer: 0,01 M Tris-HCl; 0,01 M MgCl_2 ; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Albumin aus Rinderserum.

Bottom-Agar: 0,5% NaCl; 0,5% Difco-Tryptone; 0,3% Difco-Nutrient Broth; 0,2% Maltose; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Vitamin B₁; 1,2% Difco-Bactoagar.

Top-Agar: 0,8% Difco-Nutrient Broth; 0,6% Difco-Bactoagar.

3. Herstellung von λ -Phagen mit variablem BU-Gehalt

Eine Übernachtkultur von CR 34 (λcI_{857})/ λ in TB-Medium (34 °C) wurde 1:10 in A-Medium mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Thymin verdünnt (34 °C). Bei der $\text{OD}_{650} = 0,6$ wurden die Bakterien zentrifugiert und bei 43 °C resuspendiert in A-Medium mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Thymin und BU im gewünschten Konzentrationsverhältnis. Nach 15 min wurde die Temperatur auf 34 °C gesenkt, nach weiteren 60...90 min war die Lysis abgeschlossen, Phagentiter von 1...5 · 10⁹/ml wurden erhalten. Die weitere Verarbeitung der Lyse erfolgte durch Zentrifugationen bei 8000 rpm (15 min) und 20 000 rpm (180 min); die in λ -Puffer aufgelösten, konzentrierten Phagen wurden durch einen CsCl-Dichtegradientenlauf (Spinco-Rotor SW 50.1, $\rho = 1,5 \text{ g}/\text{cm}^3$, 20 Stunden) weiter gereinigt, mit Hilfe einer Zeiss-Durchflußküvette isoliert und in λ -Puffer in Titern von 10¹¹...10¹²/ml bei 4 °C aufbewahrt.

4. Bestrahlungsexperimente

Phagensuspensionen (10¹⁰/ml) wurden in einer maximalen Schichtdicke von 0,1 cm bestrahlt. Langwelliges UV-Licht (302/313 nm) wurde aus dem Spektrum eines Quecksilberhochdruckbrenners (Philips HOQ 700) erhalten, indem das kurzwellige UV-Licht durch geeignete Interferenz-Reflexionsfilter (Schott & Gen. Mainz, UV-R 280) in Kombination mit UV-Kantenfiltern (Schott & Gen. Mainz, WG 5 und WG 6) ausgeblendet wurde. Die Dosisleistung (gemessen durch Kalium-Eisenoxalat-Aktinometrie¹³) betrug am Ort der Probe 10,84 $\text{erg} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$. Ein Quecksilber-Niederdruckbrenner (Original Hanau, NN 15/44) lieferte kurzwelliges UV-Licht (254 nm) mit der Dosisleistung 1,64 $\text{erg} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$.

5. Test auf Infektiosität

Die bestrahlten Phagen wurden in der entsprechenden Verdünnung zusammen mit 2 ml Top-Agar und 0,1 ml Bakteriensuspension (C 600) auf Petri-

schalen mit Bottom-Agar gegossen. Nach 10 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Plaques im Bakterienrasen ausgezählt. Die verwendete Bakteriensuspension wurde folgendermaßen erhalten: In TB-Medium bis zur $\text{OD}_{650} = 0,7$ gewachsene Bakterien einer Übernachtkultur (C 600) wurden in 0,01 M MgSO_4 resuspendiert und für 60 min bei 37 °C inkubiert.

III. Resultate

Der BU-Gehalt der nach II,3 erhaltenen λ -Phagen wurde durch Messung der Auftriebsdichte im CsCl-Dichtegradienten bestimmt. Gegenüber normalen Phagen (100% Thymin) ergab sich für Phagen, die in Anwesenheit von A-Medium, das nur BU enthielt, eine Dichtedifferenz von $\Delta\rho = 0,05 \text{ g}/\text{cm}^3$. Andere Autoren³ fanden $\Delta\rho = 0,04 \text{ g}/\text{cm}^3$; außerdem lässt sich unter der Annahme, daß der BU-Einbau das Volumen des λ -Phagen nicht verändert, für vollständige BU-Substitution $\Delta\rho = 0,032 \text{ g}/\text{cm}^3$ berechnen³. Hieraus und aus der Schärfe der Dichteverteilung, die für Thymin- und BU-Phagen ver-

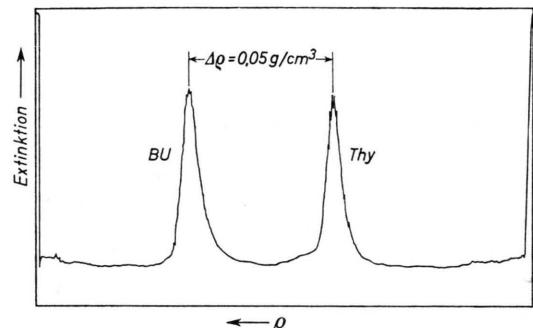


Abb. 1. Absorptionsprofile im CsCl-Dichtegradienten von normalen λ -Phagen (Thy) und BU-substituierten λ -Phagen (BU).

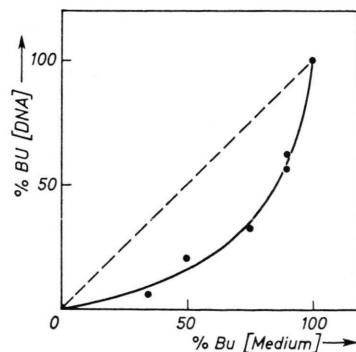


Abb. 2. Abhängigkeit des BU-Gehaltes in λ -DNA vom BU-Gehalt des Mediums.

gleichbar ist (siehe Abb. 1), wurde geschlossen, daß in den entsprechenden Phagen Thymin vollständig durch BU ersetzt ist. Abb. 2 zeigt den Anteil des BU in der DNA in Abhängigkeit vom BU im Medium.

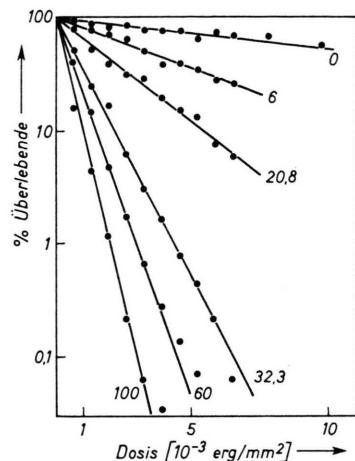


Abb. 3. Dosis-Effektkurven für λ -Phagen mit unterschiedlichem BU-Gehalt nach Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (302/313 nm). Die Zahlen an den Geraden bezeichnen den BU-Gehalt der DNA.

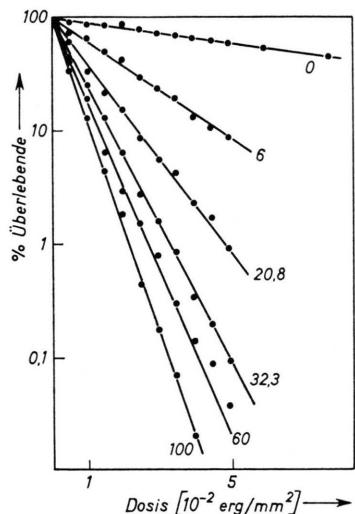


Abb. 4. Wie Abb. 3, nur Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm).

Tab. I. Zusammenstellung der D_{37} -Werte [erg/mm^2] und der Inaktivierungquerschnitte σ [$\text{cm}^2/\text{Quanten}$] für Bestrahlung mit langwelligem (302/313 nm) und kurzwelligem (254 nm) UV-Licht.

	% BU	0	6	20,8	32,3	60	100
302/313 nm	D_{37}	16200	4780	2340	943	650	390
	$\sigma \cdot 10^{17}$	0,41	1,38	2,81	7	10,11	16,9
	254 nm	983	202	100	70,8	54,1	46,2
	$\sigma \cdot 10^{17}$	7,97	38,8	78,4	110	145	170

In Abb. 3 sind die Dosis-Effektkurven für λ -I₈₅₇ nach Bestrahlung mit langwelligem UV (302/313 nm) wiedergegeben, in Abb. 4 die nach Bestrahlung mit kurzwelligem UV (254 nm). Die dazugehörigen D_{37} -Werte sind in Tab. I zu finden. Bei der angewandten Technik konnten nichtexponentielle Anteile von Dosis-Effektkurven nicht festgestellt werden. Solche Schulterkurven könnten für Phagen ohne BU erwartet werden; die geringen Inaktivierungsraten (Abbn. 3 und 4) lassen einen solchen Schluß jedoch nicht zu. Zur Berechnung der D_{37} wurden deshalb exponentielle Dosis-Effektkurven auch für normale Phagen angenommen. Mit Hilfe der Gleichung

$$N/N_0 = e^{-\sigma \cdot D}$$

(N/N_0 = relative Überlebensrate, D = Dosis in Quanten/ cm^2 , σ = Wirkungsquerschnitt in cm^2) wurden die Wirkungsquerschnitte in Abhängigkeit vom BU-Substitutionsgrad und der verwendeten Wellenlänge berechnet; diese sind ebenfalls in Tab. I angegeben.

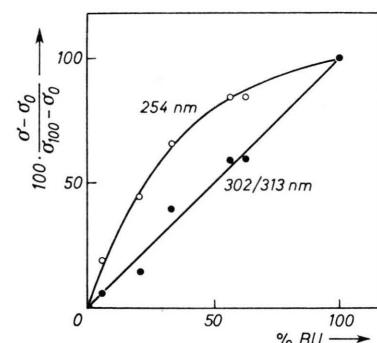


Abb. 5. Relativer Anstieg des Wirkungsquerschnittes σ (in %) in Abhängigkeit vom BU-Gehalt der DNA nach Bestrahlung mit langwelligem (302/313 nm) und kurzwelligem (254 nm) UV-Licht.

Abb. 5 zeigt den relativen Anstieg des Wirkungsquerschnittes in Abhängigkeit vom BU-Gehalt. Nach Bestrahlung mit 302/313 nm ergibt sich ein dem BU-Gehalt proportionales Anwachsen des Wirkungsquerschnittes, nach Bestrahlung mit 254 nm zeigt

sich eindeutig ein verändertes Verhalten in Form eines nicht proportionalen Anstiegs. Wenn, wie in der Einleitung schon dargelegt, dieser „Sättigungseffekt“ die Folge einer Energieleitung zum BU darstellt, und zwar im Speziellen vom Thymin zum BU, so sollte der zusätzliche Anteil $\Delta\sigma$ des Wirkungsquerschnittes, der zum nicht proportionalen Anstieg führt, proportional der Konzentration des Thymin (c_{Thy}) und des BU (c_{BU}) sein.

In Abb. 6 ist $\Delta\sigma/c_{\text{Thy}}$ als Funktion des BU-Gehaltes aufgetragen; es ergibt sich eine angenäherte Proportionalität.

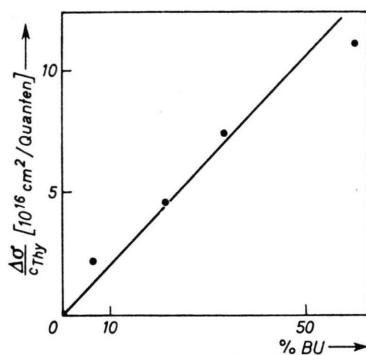


Abb. 6. Nichtproportionaler Anteil $\Delta\sigma$ des Wirkungsquerschnittes, dividiert durch die Thyminkonzentration c_{Thy} , in Abhängigkeit vom BU-Gehalt der DNA. $\Delta\sigma \equiv \sigma_{\text{exp}} - \sigma_{\text{hyp}}$, wobei σ_{exp} den tatsächlich gemessenen Wirkungsquerschnitt nach Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) darstellt (siehe Tab. I); σ_{hyp} wurde auf Grund der Hypothese berechnet, daß die Inaktivierung proportional dem BU-Gehalt verläuft.

IV. Zusammenfassung und Diskussion

Die Wellenlängenabhängigkeit der Inaktivierungsquerschnitte sowohl für normale als auch für BU-substituierte λ -Phagen läßt sich aus Tab. I berechnen. Für den Quotienten $\sigma_{254}/\sigma_{302/313}$ ergibt sich für normale Phagen ein Wert von ca. 20, für Phagen mit 100% BU ein Wert von ca. 10. Diese Werte stehen im Einklang mit an anderen Systemen gewonnenen Werten anderer Autoren¹⁴⁻¹⁶ und sind in erster Näherung durch die verschiedenen starke Absorption der DNA bzw. BU-DNA bei den entsprechenden Wellenlängen zu erklären.

Sehr ausgeprägt ist die Sensibilisierung von BU-Phagen (100%) gegenüber normalen Phagen nach Bestrahlung mit 254 nm (Faktor 20, siehe Tab. I), andere Autoren¹⁴⁻¹⁶ finden Werte zwischen 4...20. Eine Steigerung dieser BU-Sensibilisierung ergibt sich bei Bestrahlung mit 302/313 nm (Fak-

tor ≈ 40), da bei dieser Wellenlänge BU-DNA im Vergleich zu normaler DNA wesentlich stärker absorbiert. Für die weitere Betrachtung der Inaktivierungsquerschnitte bei verschiedenem BU-Substitutionsgrad folgt hieraus, daß bei Phagen mit DNA, in der Thymin nur teilweise durch BU substituiert wurde, das Ausmaß der Schädigung an den normalen Basen im Vergleich zu der am BU in erster Näherung vernachlässigt werden darf.

Das wesentliche Resultat dieser Arbeit ist die Tatsache, daß der Inaktivierungsquerschnitt σ für den Verlust der Infektiosität nach Bestrahlung mit 302/313 nm proportional dem Substitutionsgrad verläuft, nach Bestrahlung mit 254 nm aber nicht (siehe Abb. 5). Damit wurden ähnliche Befunde, die durch physico-chemische Veränderungen an der DNA nachgewiesen wurden⁶⁻⁹, mit biologischen Effekten korreliert. Eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der Wirkungsquerschnitte σ bei 302/313 nm und 254 nm könnte folgende sein: Bei Bestrahlung mit 302/313 nm wird Energie im wesentlichen nur vom BU, nicht von den anderen Basen, absorbiert; folgerichtig steigt σ proportional dem BU-Substitutionsgrad. Bei Bestrahlung mit 254 nm findet Absorption von Strahlenenergie an allen Basen der DNA statt. Da die Schädigung an den normalen Basen aber, wie schon erwähnt, gegenüber der Schädigung am BU vernachlässigt werden kann (siehe Tab. I), könnte der zusätzliche Anteil $\Delta\sigma$ des Wirkungsquerschnittes, der zum nicht proportionalen Anstieg führt, durch Energieleitung zum BU entstehen. Die von den 4 normalen Basen zum BU transportierte Energie würde dann durch Radikalreaktionen am BU zum letalen Schaden führen. Da $\Delta\sigma$ dem Produkt der Konzentrationen des Thymin und des BU nur angenähert proportional ist (siehe Abb. 6), läßt sich nicht zwingend zeigen, daß die Energieleitung vorzugsweise vom Thymin zum BU stattfindet. Dies wäre nur bei einer exakten Proportionalität plausibel. Um die Natur dieses Energieleitungsprozesses aufzuklären, sind weitere Experimente, z. B. mit Radikalfängern, erwünscht.

Herrn Prof. Dr. W. Dittrich danke ich für wertvolle Diskussionen und die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts, Frl. G. Hessing für ausgezeichnete technische Assistenz.

Diese Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

- ¹ S. Greer, J. Mol. Biol. **22**, 618 [1960].
² F. Hutchinson, Biochim. Biophys. Acta **91**, 527 [1964].
³ E. Fox u. M. Meselson, J. Mol. Biol. **7**, 583 [1963].
⁴ W. Köhnlein u. F. Hutchinson, Radiat. Res. **39**, 745 [1969].
⁵ H. S. Kaplan, Radiation Protection and Sensitization (ed. H. L. Moroson and M. Quintiliani), p. 35, Taylor & Francis Ltd., London 1970.
⁶ E. M. Fielden, S. C. Lillicrap u. A. B. Robins, Radiat. Res. **48**, 421 [1971].
⁷ S. C. Lillicrap u. E. M. Fielden, Radiat. Res. **48**, 432 [1971].
⁸ G. E. Adams u. R. L. Willson, Int. J. Radiat. Biol. **22**, 589 [1972].
⁹ W. L. Carrier u. R. B. Setlow, Abstrakt zum VI. International Congress on Photobiology, Bochum 1972.
¹⁰ R. Sussman u. F. Jacob, C. R. Acad. Sci. Paris **254**, 1517 [1962].
¹¹ T. Okada, K. Yanagisawa u. F. I. Ryan, Z. Vererbungslehre **92**, 403 [1961].
¹² R. K. Appleyard, Genetics **39**, 440 [1954].
¹³ C. G. Hatchard u. C. A. Parker, Proc. Roy. Soc. [London], Sect. A **235**, 518 [1956].
¹⁴ R. Boyce u. R. Setlow, Biochim. Biophys. Acta **68**, 446 [1963].
¹⁵ R. Setlow u. R. Boyce, Biochim. Biophys. Acta **68**, 455 [1963].
¹⁶ S. A. Rapaport, Virology **22**, 125 [1964].