

KONFORMATIONSÄNDERUNGEN VOR UND NACH DNA-SYNTHESE VERSTÄRKEN ZELLGENETISCH LETALE STRAHALENSCHÄDEN

Gerd HAGEMANN and Jürgen MELLMANN

*Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Klinische Radiologie, Arbeitsbereich Experimentelle Radiologie,
3000 Hannover-Kleefeld, Karl Wiechert Allee 9, West Germany*

Received 17 October 1975

Summary

Chinese hamster ovary fibroblasts were synchronized by mitotic selection and showed cytogenetic lethally acting radiation damages, which depended on age at irradiation time. The development of cell cultures was followed by counting of the killed cells in the 3rd daughter generation of the irradiated ones and by evaluation of the colony size spectra 73.5 h after inoculation. At a dose of 300 rads two narrow but high peaks of radiation sensitivity were induced, which appeared at the beginning and at the end of the S-phase of the cell cycle and therefore are reduced to conformational changes of the DNA. Consequently the DNA-superstructures linking pieces of the nucleoprotein-fibre during fastening to, and detaching from, the nuclear membrane are assumed to be the loci of the increased radiation sensitivity.

1. Einleitung

Chromosomenverletzungen können zu reproduktiv-lethalen Schädigungen (RLS) führen und außer durch Röntgenstrahlen und Pharmaka auch durch Einfrier-Auftau-Vorgänge erzeugt werden. RLS von Säugerzellen bewirken in ihren Tochtergenerationen die vereinzelte Entstehung toter Zellen, ohne daß der Stammbaum dadurch in jedem Falle ausstirbt. Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO) bilden z.B. nach einer Röntgenstrahlendosis von 300 rd in der 3. Generation nach Bestrahlung rund 30% tote Zellen [1]. Diese getöteten Zellen lassen sich bis zu ihrer Lyse durch In-Vivo-Färbung der Zellkultur mit Nigrosin sichtbar machen.

Als Folge des in den Tochtergenerationen einer bestrahlten Zelle gelegentlich auftretenden, durch RLS verursachten Zelltodes enthalten betroffene Zellstammbäume nach 6 oder 7 Teilungen weniger Zellen als unbestrahlte Kontrollen. Durch Auszählung der Zellzahl je Kolonie von über 150 Zellkolonien läßt sich eine Koloniegrößenverteilung ermitteln [2]. Die Häufigkeit der Koloniegrößen wird gegen Kolonie-

größenintervalle aufgetragen. Die Anzahl der Intervalle ist durch die Zahl der bis zum Zeitpunkt der Zählung vollzogenen Teilungen nach Inokulation unbestrahlter Kontrollen gegeben. Aus den so bestimmten Koloniegrößenverteilungen kann dann die Zahl der Zellen in 100 Kolonien berechnet werden, die als mittlere zelluläre Multiplizität bezeichnet wird.

Diese beiden einfachen Methoden wurden wegen ihrer Genauigkeit eingesetzt, um die Häufigkeit der RLS in Abhängigkeit von der Phase im Zellzyklus mit hoher zeitlicher Auflösung zu bestimmen.

2. Material und Methodik

Es wurde ein Stamm tetraploider CHO-Zellen verwendet, der 1971 aus einer heterogenen Population durch Selektion eines kompakt wachsenden Clons gewonnen worden war. 1971 wurde der Stamm nach Zugabe von 5% Glyzerin zum Nährmedium eingefroren und bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs bis zum Auftauen am 5.6. 1973 aufbewahrt. Seit dem wurde er fortlaufend weitergezüchtet und in 10

Meßserien von August 1973 bis Juni 1974 für die hier referierten Untersuchungen verwendet.

Die Generationszeit der Zellen beträgt 12 ± 1.5 Std., die Spontantodrate liegt stets unter 5%. Die Synchronisation erfolgte durch mitotische Selektion, wobei die Spontantodrate konstant blieb. Etwa 1000 synchronisierte Zellen mit einem Synchronisationsgrad über 90% wurden je (Polystyrol-)Petri-Schale (Flow) ausgesät. Im Kulturmedium M 199 (Flow) bei pH 7.2 und $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ unter Luft-5% CO₂ wuchsen die Zellen nach Aussaat 44 Std. bis zur Zählung der reproduktiv getöteten Zellen oder 73.5 Std. bis zur Koloniegrößenbestimmung. Die Bestrahlungsdosis von 300 rd erhielten je Bestrahlungszeit zwei Petri-Schalen, die Zeitabstände betrugen $\frac{1}{2}$ oder 1 Std. von der 1. bis zur 12. Std. nach Synchronisation. Die Bestrahlung mit einem 200 kV-Röntgengenerator (Siemens, Stabilipan), bei 2.0 mm-Al Filter erfolgte bei 37°C unter Luft-5% CO₂-Gemisch. Die Dosisleistung betrug 80 rd/Min., die Dosismessung erfolgte mit einer Ionisations-Normalkammer zum Simplex-Dosimeter (Physikalisch-Technische-Werkstätten).

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Zahl der durch RLS entstandenen toten Zellen in der 3. Generation nach Synchronisation hängt unerwartet stark vom Zellalter ab (Abb. 1a). Schmale, aber ausgeprägte Maxima treten in der 4. und 9. Std. auf. Die mittlere zelluläre Multiplizität zeigt bei etwa gleichen Zellaltern ebenso scharf ausgeprägte Minima (Abb. 1b). Die Halbwertsbreite der 5 Std.-Extrema liegt bei ± 45 Min und der 9 Std.-Extrema bei ± 15 Min. Mit der Bestimmung der Zeitdifferenz zwischen beiden Extrema zu (4.5 ± 0.5) Std. ist dieser Zeitraum innerhalb der DNA-Syntheseperiode festgelegt. Experimente mit [³H]TdR Pulsmarkierung überwiegend diploider CHO-Zellen [3] ergaben für die Synthesedauer Werte um 8 Std. bei Generationszeiten um 15 Std.

Diese gegenüber den eigenen Zahlen um etwa 3 Std. größeren Werte können der Thymidinwirkung zugeschrieben werden.

Die zeitliche Koinzidenz der Extrema mit den Konformationsänderungen der DNA zu Beginn und am Ende der Synthesephase kann am einfachsten durch Annahme eines ursächlichen Zusammenhangs

erklärt werden. Daraus folgt dann wegen der gemessenen, geringen Halbwertsbreite der Extrema, daß Membranallagerung und -ablösung der membrangebundenen DNA [4-8] in einem Zeitraum weniger Minuten vollzogen sein muß. Dieser Folgerung widersprechen nicht bisher

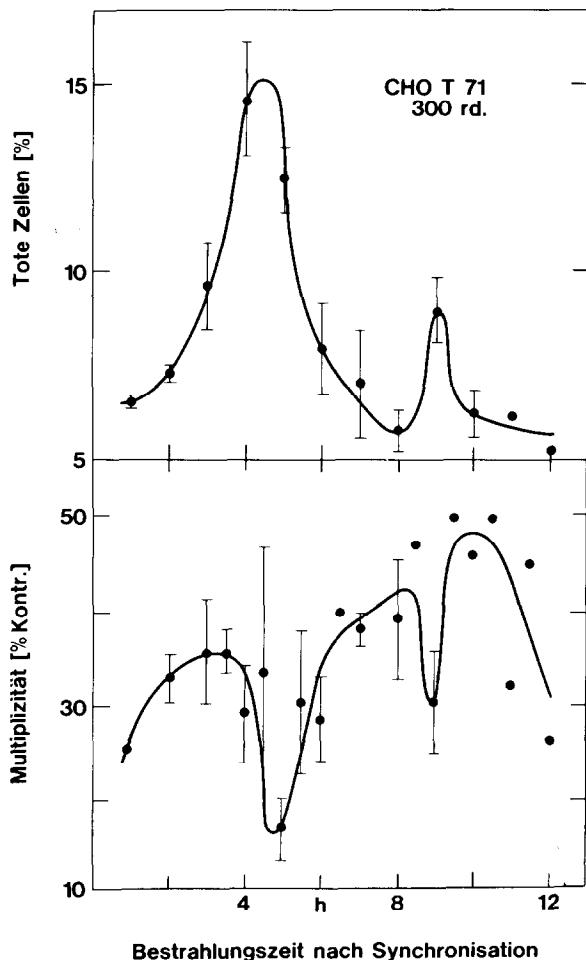


Abb.1. (a) Abhängigkeit der nach 44 Std. Inkubation vorhandenen Zahl toter Zellen einer tetraploiden Linie von CHO-Fibroblasten vom Zellalter der Ausgangspopulation bei Röntgenbestrahlung mit 300 rd. Die reproduktiv getöteten Zellen gehören zur F 3-Generation und wurden durch In Vivo-Färbung mit Nigrosin markiert. Die Zahl spontantotter Zellen unbestrahlter Kontrollpopulationen lag stets unter 5%. (b) Abhängigkeit der aus Koloniegrößenverteilungen berechneten zellulären Multiplizität vom Zellalter nach Röntgenbestrahlung mit 300 rd. Die Inkubationszeit betrug $73 \frac{1}{2}$ Std. nach Synchronisierung. (\pm = Standardabweichung der Mittelwerte.)

angenommene Bildungsmechanismen der DNA-Superstrukturen: Supercoiling der kontinuierlichen DNA-Doppelhelix ist bis zur Ordnung $n = 3$ [9] bei Säuger-DNA unwahrscheinlich, da der Transport des Drehimpulses über die Länge der räumlich vielfach gewundenen Spirale unökonomisch ist. Der Energieverbrauch in Flüssigkeiten rotierender Zylinder wird auch bei kleinen Umfangsgeschwindigkeiten durch Bildung von Ringwirbeln verursacht [10].

Andererseits haben Pooley, Pardon und Richards [11] in vergleichenden Untersuchungen gezeigt, daß die bisher beobachteten Superstrukturen der DNA entscheidend von der Probenpräparation abhängen und daraus den Schluß gezogen, daß die reguläre Tertiär-Struktur bei der Probenpräparation verloren geht.

Das Modell der kontinuierlichen 'folded fibre'-Struktur [12] muß daher durch ein diskontinuierliches Modell ersetzt werden, wie es durch die Ergebnisse der Sedimentationsanalyse [13] nahegelegt wird. Die in solchen Untersuchungen gefundenen DNA-Subeinheiten können z.B. als kondensierte Replikons betrachtet werden, wenngleich für deren Feinstruktur verschiedene Vorschläge [9,14,15] gemacht wurden. Man erhält dann eine einfache Erklärung für die beobachteten Extrema, wenn man – möglicherweise unter Mitwirkung kürzlich nachgewiesener nuklearer Enzyme hoher Strahlenempfindlichkeit [16] – nur während der Membranverankerung und -ablösung und nur in dem, die kondensierten Replikons verbindenden Nukleoproteinfaden wegen der dort vorhandenen Scher- und Zugspannung eine erhöhte Bruchwahrscheinlichkeit bei Bestrahlung annimmt.

Danksagung

Frau H. Nachtegal danken wir für die Bereitstellung der benötigten Mengen synchronisierter Zellen.

Literatur

- [1] Hagemann, G. (1973) *Strahlenther.* 145, 456–473.
- [2] Töllner, D., Hagemann, G. und Stender, H. St., (1973) *Strahlenther.* 145, 604–611.
- [3] Leeper, D. B., Schneiderman, M. H. und Dewey, W. C. (1973) *Radiat. Res.* 53, 326–337.
- [4] Worcel, A. und Burgi, E. (1974) *J. Mol. Biol.* 82, 91–105.
- [5] Dingman, C. W., Fisher, M. P. und Ishizawa, M. (1974) *J. Mol. Biol.* 84, 275–295.
- [6] Huberman, I. A. und Riggs, A. D. (1968) *J. Mol. Biol.* 32, 327.
- [7] Huberman, I. A. und Tsai, A. (1973) *J. Mol. Biol.* 75, 5–12.
- [8] Franke, W. W., Deumling, B., Zentgraf, H., Falk, H. und Rae, P. M. M. (1973) *Exp. Cell. Res.* 81, 365–392.
- [9] Lang, D. (1973) *J. Mol. Biol.* 78, 247–254.
- [10] Taylor, G. I. (1923) *Phil. Trans.* 223, 289–344.
- [11] Pooley, A. S., Pardon, I. F. und Richards, B. M. (1974) *J. Mol. Biol.* 85, 533–549.
- [12] DuPraw, E. J. (1965) *Nature* 206, 338–343.
- [13] Maniatis, T., Venable, I. H. und Lerman, L. S. (1974) *J. Mol. Biol.* 84, 37–64.
- [14] Varshavsky, A. I., Ilyin, Yu. V. und Georgiev, G. P. (1974) *Nature* 250, 602–606.
- [15] Lange, C. S. (1974) *FEBS Lett.* 44, 153–156.
- [16] Streffer, C. und Beisel, P. (1974) *FEBS Lett.* 44, 127–130.