

fb AT 7900038

SGAE BER, No. 2990

BL-246/78

OKTOBER 1978

**Berichte der  
Österreichischen Studiengesellschaft  
für Atomenergie Ges. m. b. H.  
Forschungszentrum Seibersdorf**

EINE METHODE ZUM NACHWEIS VON GERINGEN STRAHLENSCHÄDEN  
IN DER DNA VON EUKARIOTISCHEN ZELLEN

PETER WENIGER

EINE METHODE ZUM NACHWEIS VON GERINGEN STRAHLENSCHÄDEN  
IN DER DNA VON EUKARIOTISCHEN ZELLEN.

Peter Weniger

Englische Kurzfassung zur Veröffentlichung  
vorgesehen in "Analytical Biochemistry"

Österreichische  
Studiengesellschaft für Atomenergie  
Ges.m.b.H.  
Lenaugasse 10 A-1082 Wien

INSTITUT FÜR BIOLOGIE  
Forschungszentrum Seibersdorf

EINE METHODE ZUM NACHWEIS VON GERINGEN STRAHLENSCHÄDEN IN DER DNA VON EUKARIOTISCHEN ZELLEN.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Eine in den letzten Jahren entwickelte Technik der neutralen Gradientenzentrifugation wurde modifiziert, um häufig vorkommende Fehlerquellen auszuschalten. Die Methode basiert auf einer vorsichtigen Lyse der Zellen mit einem nicht-ionischen Detergens bei hoher Salzkonzentration und anschließender Zentrifugation in einem neutralen Saccharose-Etidiumbromid-Gradienten. Die Position der DNA-Bande kann auf Grund der Fluoreszenz des DNA-EtBr Komplexes bestimmt werden, ohne den Gradienten zu fraktionieren. Es ist auf diese Weise möglich, Strahlenschäden von 100 rad  $\gamma$ -Strahlung eindeutig zu erfassen.

SCHLÜSSELWORTE: DNA-Strangbrüche, Supercoiled DNA, Neutrale Saccharosegradienten.

A METHOD FOR DETECTION OF SMALL RADIATION DAMAGE IN THE DNA OF EUKARIOTIC CELLS.

#### SUMMARY

A technique of neutral sucrose gradients, developed in the last years, was modified to avoid some often occurring sources of error. The method is based on a mild lysis of the cells with a nonionic detergent in high salt concentration and subsequent centrifugation in a neutral sucrose - etidium-bromide - gradient. The position of the DNA can be seen without fractionating the gradient because of the fluorescence of the DNA-EtBr complex. In this way it is possible to detect clearly the radiation damage of 100 rad  $\gamma$ -irradiation.

KEY-WORDS: DNA strand breaks, supercoiled DNA, neutral sucrose gradients.

EINE METHODE ZUM NACHWEIS VON GERINGEN STRAHLENSCHÄDEN  
IN DER DNA VON EUKARIOTISCHEN ZELLEN

1. EINLEITUNG

Um Schädigungen von ionisierender Strahlung an der DNA nachzuweisen, stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung: Die Zentrifugation in alkalischer Saccharose ( 9,13 ), Hydroxylapatit-Chromatographie ( 1 ), BND-Zellulose-Chromatographie ( 11 ), enzymatische Bestimmung von veränderten Basen ( 5,15 ), Chromatographie der hydrolysierten DNA ( 4,6 ) und Zentrifugation in neutraler Saccharose. Die letztere Methode, ursprünglich zur Bestimmung der DNA-Doppelstrangbrüche verwendet ( 13 ), wurde in den letzten Jahren auch zu einer sehr empfindlichen Methode zur Bestimmung von Einzelstrangbrüchen ausgearbeitet ( 7,3,8,10,16 ). Sie funktioniert nach folgendem Prinzip: Zellen werden direkt am Gradienten in hoher Salzkonzentration mit einem nichtionischen Detergens lysiert. Dadurch werden aus dem Zellkern die meisten Proteine entfernt, die DNA und RNA bleiben aber als Komplex erhalten. Durch Reste von Membranen und Proteinen ist die freie Drehbarkeit der DNA stark eingeschränkt, sodaß die negativen superhelikalen Windungen erhalten bleiben. Die Struktur dieses Komplexes ist daher sehr kompakt und der Komplex weist eine hohe Sedimentationskonstante auf. Durch Einzelstrangbrüche wird die freie Drehbarkeit der DNA erhöht und die superhelikalen Windungen gehen verloren. Dadurch wird die Struktur lockerer und die Sedimentationskonstante verringert sich. Die Methode hat den Vorteil, sehr empfindlich zu sein. Eine Bestrahlungsdosis von 100 rad  $\gamma$ -Strahlung ist bereits eindeutig nachweisbar. Damit ist diese Methode geeignet, auch subletale

Dosen von  $\gamma$ -Strahlung bzw. die Reparatur dieser Strahlenschäden zu messen.

Auf Grund der Beschaffenheit der DNA im Gradienten weist die Methode aber eine Reihe von Fehlerquellen auf. Die DNA sedimentiert nämlich nicht in Form einzelner Moleküle, sondern als ein einziges Aggregat. Dieses Aggregat, das normalerweise als horizontale Scheibe im Gradienten sedimentiert, neigt dazu "umzukippen" und sedimentiert dann als fadenförmiges Gebilde weiter. Dieser "Faden" kann von der Auftragsstelle bis zum Boden reichen. Beim Fraktionieren über eine Pumpe wird jedoch auf Grund der Viskosität des Fadens ein großer Teil der DNA auf einmal angesaugt und täuscht somit einen korrekten Peak vor, dessen Position allerdings in keinem Zusammenhang mit der Zahl an DNA-Strangbrüchen steht. Aber selbst bei einer korrekt sedimentierenden DNA kann beim Einbringen einer Glaskapillare oder Nadel die DNA daran hängenbleiben und am Beginn des Gradienten ausgepumpt werden. Dadurch wird ein Peak am Boden des Röhrchen vorgetäuscht, der in Wirklichkeit eine ganz andere Position einnimmt.

Um diese Fehlermöglichkeiten zu vermeiden, wurde versucht, die DNA direkt im Gradienten sichtbar zu machen und so das Auspumpen zu vermeiden. Nach einigen ergebnislosen Versuchen mit Farbstoffen wie Methylgrün, Eosin, Methylblau und Pyronin erwies sich Ethidiumbromid als geeignetes Mittel. Ethidiumbromid hat allerdings die Eigenschaft, die Anzahl der superhelikalen Windungen zu verändern. Mit steigender Konzentration werden zunächst die negativen superhelischen Windungen entfernt und dann positive Windungen induziert. Die Sedimentationskonstante von DNA ohne Brüche nimmt daher zuerst ab und dann wieder zu (Abb.1). Will man einen möglichst großen Unterschied zwischen nativer und gebrochener DNA, so muß man entweder bei sehr geringer (unter 1  $\mu\text{g/ml}$ ) oder bei sehr hoher (über 15  $\mu\text{g/ml}$ ) EtBr-Konzentration arbeiten. In dieser Arbeit wurden 30  $\mu\text{g/ml}$  verwendet.

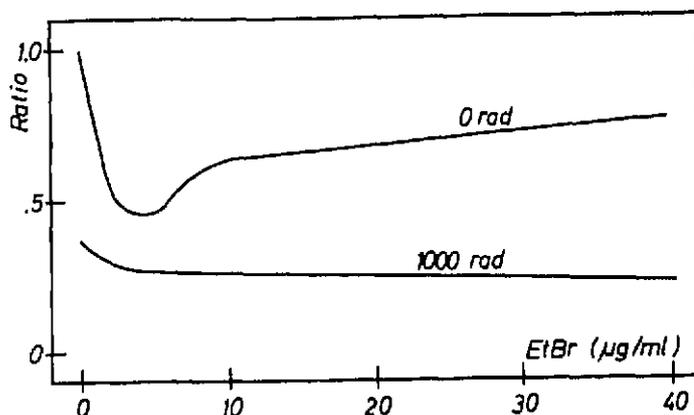


Abb.1: Beeinflussung der Sedimentation von DNA durch Ethidiumbromid. Unbestrahlte, sowie mit 1 krad bestrahlte HeLa Zellen wurden bei verschiedenen EtBr Konzentrationen zentrifugiert. (Die Werte stammen aus Literatur Nr. 7 ).

## 2. METHODE

In Zellulosenitratröhrchen für den Beckman SW40 Rotor wurden ca 12 ml linearer 15 - 30 %iger Saccharosegradient hergestellt. Der Gradient enthielt 1.5 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA<sub>Na<sub>2</sub></sub> und 30 µg/ml EtBr. Der Gradient wird mit 0.4 ml einer Lösung von 1.5 M NaCl, 0.1 M EDTA pH 8.0 und 0.7 % Triton X 100 überschichtet. Darauf werden 0.2ml Zellsuspension ( $10^7$  Zellen/ml, in PBS oder Nährmedium) zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Danach wird bei 20°C zentrifugiert. Die Zentrifugationsbedingungen richten sich nach der Zellart.

Als Richtwerte gelten:

Rattenmilz-, Mäusemilzzellen	110 Min bei 28000 UpM
Menschl. Lymphozyten	80 Min bei 25000 UpM
Mausthymuszellen	120 Min bei 25000 UpM
3T3 Zellen (Mausfibroblasten)	60 Min bei 15000 UpM
HeLa Zellen	60 Min bei 7000 UpM

Nach der Zentrifugation wurden die Röhrchen mit einer 350 nm UV Lampe beleuchtet und die Position der rot fluorezierenden DNA markiert. Für den Beckman SW40 Rotor ergibt sich die ( unkorrigiert ) Sedimentationskonstante aus der Formel:

$$S = (2.35 \times 10^5 \times l) / (w^2 t)$$

S = Sediment. Konst. in Svendberg Einheiten

l = Sedimentationstrecke in mm

w = Umdrehungszahl in  $10^3$  UpM , t = Zeit in Minuten

Das Verhältnis ("Ratio") von Sedimentationskonstante der bestrahlten Zellen zur Sedimentationskonstante der Kontrollzellen ist ein Maß für die Dosis der  $\gamma$ -Strahlung bzw. für die Zahl der Einzelstrangbrüche (Abb.2).

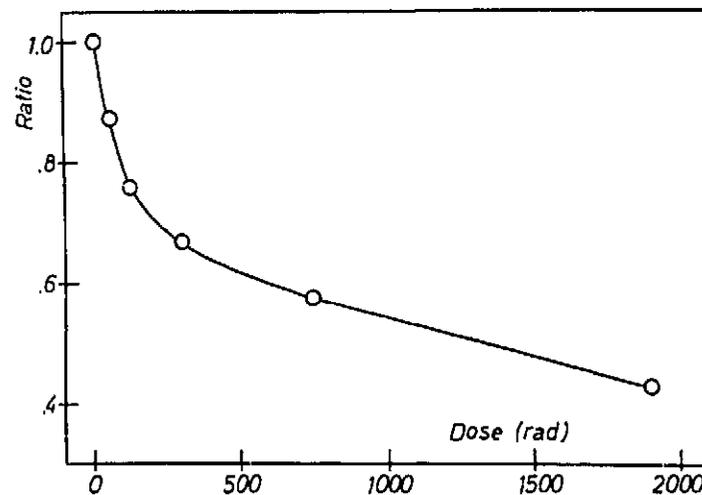


Abb.2: Relative Sedimentationsgeschwindigkeit ("Ratio") von bestrahlten Zellen.

Mausthymuszellen wurden in eiskaltem PBS suspendiert, mit  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -Strahlen bestrahlt und unmittelbar danach wie im Text beschrieben zentrifugiert. Die Sedimentationsgeschwindigkeit der unbestrahlten Zellen wurde gleich 1 gesetzt.

### 3. ERGEBNISSE

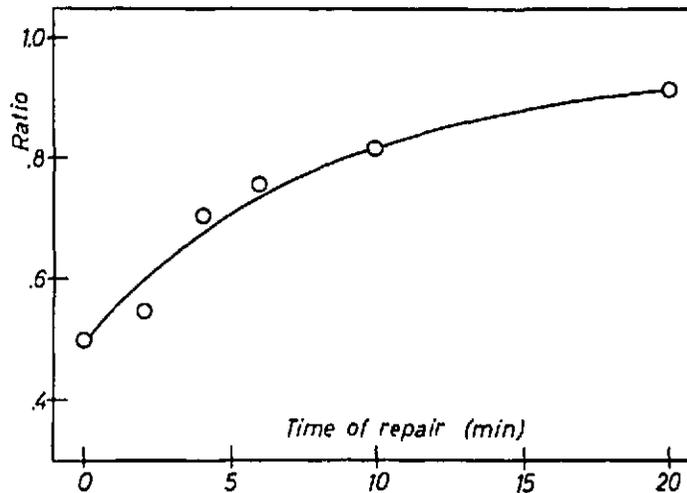


Abb.3: Reparatur von DNA-Strangbrüchen. Mausthymuszellen ( $2 \times 10^7$ /ml) wurden in PBS suspendiert und bei  $0^\circ\text{C}$  mit 1 krad bestrahlt. Danach wurde 1 Volumen Nährmedium zugesetzt (Parker 199 mit 10% Kalbserum) und bei  $37^\circ$  inkubiert. Nach bestimmten Zeiten wurde die Reparatur durch Kühlen auf  $0^\circ$  gestoppt und die Zellen am EtBr Gradienten zentrifugiert.

Abb.3 zeigt die Messung der Reparatur von DNA-Strangbrüchen in Mausthymuszellen nach Bestrahlung mit 1000 rad  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlen. Der Zeitverlauf des "rejoining" stimmt mit Messungen mit dem alkalischen Saccharosegradienten überein (2,14). Die Sedimentationskonstante der DNA ändert sich im Bereich von 1 bis 2 M NaCl nicht wesentlich. Bei Salzkonzentrationen unter 0.8 M kommt es zu keiner Trennung der Proteine von der DNA und die Sedimentationskonstante steigt stark an. Bei über 2 M NaCl sinkt die Sedimentationskonstante etwas (Abb.4.).

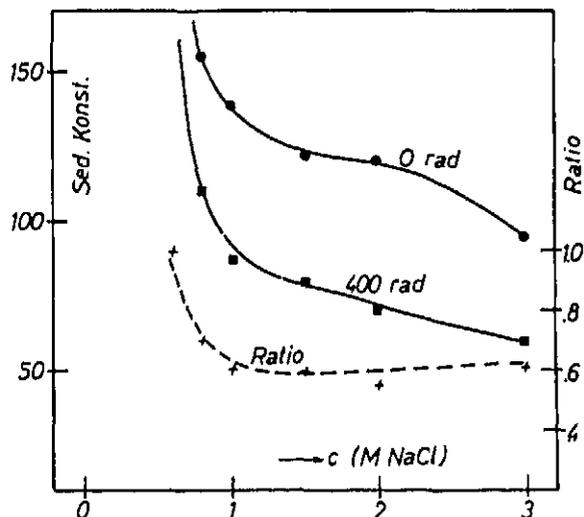


Abb.4: Abhängigkeit der Sedimentationskonstante von der NaCl-Konzentration im Gradienten. Mausthymuszellen, unbestrahlt und mit 400 rad bestrahlt, wurden im Gradienten mit verschiedener NaCl-Konzentration zentrifugiert. Die "Ratio" ist das Verhältnis von Sed.Konst. der bestrahlten Zellen zur Sed.Konst. der unbestrahlten Zellen.

Die Sedimentationskonstante ist weitgehend unabhängig von der Zentrifugationsgeschwindigkeit. Bei Mausthymuszellen kann zwischen 40 000 und 200 000 g ( $18 - 40 \times 10^3$  UpM) zentrifugiert werden.

Die vorher besprochene Fehlermöglichkeit des "Umkippen" des DNA-Peaks ist natürlich auch im Ethidiumbromidgradienten gegeben. Da man die DNA aber sehen kann, ist es leicht möglich, diese Fehler (Abb.5) zu erkennen und die falschen Resultate auszuschneiden.

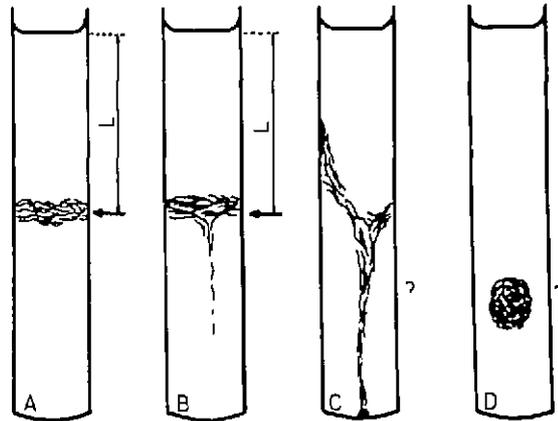


Abb.5: Fehlermöglichkeiten bei den EtBr Gradienten.  
A: Korrekt sedimentierende DNA B: Beginn einer Fadenbildung  
C: Fadenförmiges DNA Gebilde. D: Geklumpete DNA.  
Bei A und ev. auch bei B kann der richtige Sedimentationsweg bestimmt werden (Pfeil). Bei C und D ist das nicht mehr möglich ( die Kugel in D bandet nicht an der richtigen Stelle).

Da die DNA als Aggregat sedimentiert, ist es nicht möglich, bestrahlte und unbestrahlte Zellen zu mischen und beide Peaks in einem Gradienten zu erhalten. Man erhält in diesem Fall nur einen Peak, dessen Sedimentationskonstante zwischen der von Kontrollzellen und der von bestrahlten Zellen liegt.

4.LITERATURE

1. Ahnström,G. and Edwardson,K.A.(1974), Int.J.Fad.Biol.26, 493-497.
2. Ben-Hur,E.,Elkind,M.M.(1974), Radiation Res.59, 484-495.
3. Benyajati,Ch. and Worcel,A.(1976) Cell 9, 393-407.
4. Breter,H.J., Weinblum,D. and Zahl,R.K.(1974), Analyt. Biochem. 61, 362-366.
5. Buhl,St.N.and Regan,J.D.(1973) Nature 264, 484-485.
6. Cook,K.H. and Friedberg,E.C.(1976) Analyt.Biochem. 73, 411-418.
7. Cook,P.R. and Brazell,I.A.(1975) J.cell sci. 19, 261-279.
8. Cook,P.R. and Brazell,I.A.(1976) Nature 263, 679-682.
9. Epstein,J.,Williams,J.R. and Little,J.B.(1973) Proc.Nat. Acad.Sci.USA 70, 977-981.
10. Hecht,R.M., Simpson,D. and Pettijohn,D.(1977) J.Molec. Biol. 111, 257-277.
11. Scuderio,D.,Henderson,D.,Norin,A. and Strauss,B.(1975) Mutation Res. 29, 473-488.
12. Stonington,O.G. and Pettijohn,D.E,(1971) Proc.Nat.Acad. Sci.USA, 68, 6-9.
13. Studier,F.W.(1965) J.Molec.Biol. 11, 373-390.
14. Weniger P., Wawon E.,Polejs I.: SGAE Ber.No.2888 B1 219/78
15. Wilkins,R.J.(1973) Biophys.Biochem.Acta 312, 33-37.
16. Worcel,A. and Burgi,E.(1972), J.Molec.Biol. 71, 127-147.

SGAE-Berichte: Eigentümer, Herausgeber, Verleger und Druck:  
Österreichische Studiengesellschaft für Atomenergie Ges.m.b.H.  
Nach dem Pressegesetz verantwortlich:  
o.a. Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. Franz JEGLITSCH,  
alle Lenaugasse 10, 1082 Wien, Tel. (0222) 42 75 11, Telex 7-5400

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor.