

Sedimentation von Nukleoiden aus Thymus- und Milzzellen der Ratte nach Ganzkörper-Röntgenbestrahlung

Sedimentation of Nucleoids from Thymic and Splenic Cells of the Rat Following Total-Body X-Irradiation

Karlheinz Tempel und Rüdiger Heinzelmann

Arbeitsgruppe Radiologie am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, Königinstraße 16, D-8000 München 22, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **43c**, 126–132 (1988); received August 14/October 2, 1987

X-Irradiation, Rat Thymic Cells, Rat Splenic Cells, Nucleoids, DNA-Protein-Cross-links

The sedimentation of nucleoids from thymic and splenic cells of rats was tested following total-body X-irradiation (TBI) with doses ranging from 24 to 1520 cGy. The principal results may be summarized as follows: 1) The nucleoid sedimentation of the cells was reduced immediately after TBI with doses of ≥ 760 cGy. In the following postirradiation period, an enhancement of sedimentation rate has been observed which could be neutralized by addition of proteinase K to the nucleoid preparation. 2) When nucleoids were prepared 6 h after TBI with doses ≥ 190 cGy, beside the main nucleoid band a smaller nucleoid fraction appeared in the ethidium bromide containing saccharose gradient. This fraction was of less sedimentability than the main nucleoid peak and could not be distinguished from pure, high molecular DNA. — From the present results it is suggested that the reduction of the nucleoid sedimentation immediately following high doses of TBI is the result of primary (non-repaired) DNA lesions whereas the changes detectable some hours later are due to the secondary enzymatic changes connected with the interphase death of the cells. With respect to the detection of *in vivo* effects of X-irradiation, the nucleoid sedimentation has to be regarded much less sensitive than some biochemical and/or cytomorphological methods.

Einleitung

Bei Aufschluß von Zellen in Medien hoher Salzkonzentration in Gegenwart nicht-ionischer Detergentien bilden sich subzelluläre Partikel, welche die Desoxyribonukleinsäure (DNA) des Zellkerns, Ribonukleinsäure und Spuren von Protein enthalten und bei Ultrazentrifugation im neutralen Saccharosegradienten in Form eines gelartigen Aggregats als einheitliche Fraktion sedimentieren. Entsprechend ihrer Herkunft aus dem Zellkern werden diese Partikel als Nukleotide bezeichnet [1–3]. Durch Zusatz geeigneter Fluorogene (gebräuchlich Ethidiumbromid oder Bisbenzimid bzw. DNA-Farbstoff Hoechst 33258) zur Gradientenlösung kann die Nukleotidzone aufgrund ihrer Fluoreszenz im Ultraviolettlicht sichtbar gemacht und in Lage und Ausdehnung vermessen werden.

Unter Standardbedingungen spiegelt die Sedimentierbarkeit der Nukleotide den Relaxationsgrad bzw. die superhelikale Struktur der DNA wider. DNA-Strangbrüche z.B. erhöhen die DNA-Relaxation

und vermindern somit die Nukleotidsedimentation [2–4]. Werden Säugetierzellen *in vitro* röntgenbestrahlt, lassen sich so noch Strahlendosen ≥ 25 –50 cGy [3–9] bzw. 1 Einzelstrangbruch pro $2,2 \times 10^{10}$ Da DNA [10] nachweisen. Über die Eignung der Methode als Bioindikator einer Strahlenexposition von Zellen (z.B. von Lymphozyten) *in vivo* liegen bisher u.W. keine Erfahrungen vor. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Sedimentation von Nukleotiden aus Thymus- und Milzzellen der Ratte 1–6 h (d.h. im Zeitraum der Entwicklung des „Interphasetodes“) nach Ganzkörper-Röntgenbestrahlung (GKB) mit Dosen von 24–1520 cGy untersucht.

Material und Methodik

Die Versuche wurden mit weibl., 180–220 g schweren, etwa 3 Monate alten Wistar-Ratten aus institutseigener, konventioneller Zucht durchgeführt. Die Tiere wurden bei Raumtemperaturen von 22–24 °C gehalten und erhielten Standardfutter („Alma-Standard-Diät H 1003“) und Trinkwasser *ad libitum*. Die Röntgenbestrahlung erfolgte in einem oben offenen Glaszylinder ($\varnothing$ 20 cm) unter schonender Fixation der Tiere in einem höhenverstellbaren

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. K. Tempel.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/88/0100–0126 \$ 01.30/0

Drahtnetz. Die Expositionsdaten lauten wie folgt: Kristalloflex 4 der Fa. Siemens und Halske, Erlangen, Scheitelspannung 60 kV, Heizstrom 30 mA, Filterung mit 0,16 mm Cu, Fokus-Tier-Abstand 20 cm, Energiedosisleistung 76 cGy/min.

Zum gewünschten Versuchszeitpunkt nach Exposition wurden die Tiere in oberflächlicher Äthernarkose dekapitiert und entblutet. Gewinnung der Zellen, Zellyse, Nukleoidsedimentation und Auswertung folgten den zuletzt in *l.c.* [11] ausführlicher dargestellten Verfahren. Die Zentrifugenhülsen (Kontroll Cellulose-Tubes HT 91-90426) enthielten einen linearen (15–30%) Saccharose-Gradienten (in 1 l Saccharoselösung – pH 8,0, Einstellung mit 1 mol HCl/l – waren 1,5 mol NaCl, 0,02 mol Tris-Puffer, 1 mmol Äthylendiamintetraessigsäure – EDTA- Na_2 – und 30 mg Ethidiumbromid oder 1 mg Bisbenzimid enthalten). Das Füllungsvolumen betrug 9,86 ml. Zur Freisetzung der Nukleoidfraktion wurde der Saccharosegradient mit 340 μl der Lyselösung (pH 8,0, 1,5 mol NaCl, 0,1 mol EDTA- Na_2 und 7 g Triton X-100 pro Liter) und 250 μl Zellsuspension ($3,75 \times 10^6$ Zellen) überschichtet. Nach 30 min Lysezeit – unter Lichtabschluß bei Zimmertemperatur – wurden die Proben in dem Rotor SW 41 der Ultrazentrifuge Typ L2 der Fa. Beckman 90 min lang bei 25000 U/min und 20 °C zentrifugiert. Als Sedimentationsstrecke wurde die Entfernung der Bandenmitte vom oberen Flüssigkeitsmeniskus der Zentrifugenhülsen definiert. Der DNA-Gehalt der Zellsuspensionen wurde spektrophotometrisch bei 260 nm unter Verwendung einer Eichlösung aus hochmolekularer Kalbsthymus-DNA bestimmt.

Alle Reagentien waren Präparate der Firmen Sigma, Taufkirchen, EGA-Chemie, Steinheim, Merck, Darmstadt, Serva, Heidelberg, oder Calbiochem, Frankfurt. Je Analysenwert wurden 3 Sedimentationen durchgeführt. Die arithmetischen Mittel der Versuchswerte wurden anhand des t-Tests nach Student auf der Basis $p < 0,05$ miteinander verglichen.

Ergebnisse

1. Zeitabhängigkeit strahleninduzierter Veränderungen

Innerhalb des gewählten Versuchszeitraumes von 6 h zeigte die Sedimentation von Thymus- und Milznukleoiden von Ratten nach GKB mit einer Testdosis von 760 cGy eine Verkürzung der Sedimentationsstrecke um etwa 30% gegenüber den – schein-

bestrahlten – Kontrollen, sobald die Organe unmittelbar nach Strahlenexposition entnommen worden waren (Abb. 1). Die anfangs ausgeprägte Verminderung der Nukleoidsedimentation wurde mit zunehmendem zeitlichen Abstand von der Bestrahlung schwächer und ging schließlich in eine Verlängerung der Sedimentationsstrecke über, so daß 6 h nach GKB die Milznukleotide etwa 10% und die Thymusnukleotide rund 45% weiter wanderten als die Kontrollproben. Bei den Thymuszellen setzte die Phase beschleunigter Nukleoidsedimentation etwas schneller ein als bei den Milzzellen (Abb. 1).

2. Dosisabhängigkeit strahleninduzierter Veränderungen

Den o.a. Reaktionsphasen entsprechend wurde die Dosisabhängigkeit der durch die GKB ausgelösten Veränderungen an Thymuszellen bei Gewinnung unmittelbar sowie 6 h nach Exposition untersucht. Erfolgte die Organentnahme unmittelbar nach Strahlenexposition, war die Sedimentationsstrecke der Nukleotide nur nach Dosen von 760 und 1570 cGy – signifikant – um etwa 20% vermindert (Abb. 2). Die gleichen Dosen führten 6 h nach GKB zu einer gegenüber den Kontrollen um 25 bzw. 45% verlängerten Sedimentationsstrecke (Abb. 3). Zusätzlich zeigte sich folgendes Phänomen: Nach GKB der Tiere mit Dosen ≥ 190 cGy trat bei dem üblichen Analysengang unterhalb des Flüssigkeitsmeniskus eine schmale Extrabande auf. Diese – mit gelbweißem Farbton fluoreszierende – Zone war nur in den Gradienten sichtbar, die Ethidiumbromid enthielten (Abb. 4). Sowohl der Abstand dieser Extrabanden vom oberen Flüssigkeitsmeniskus der Proben als auch die Breite der Zonen nahm dosisabhängig zu (Tab. I). Die Bestimmung der DNA-Menge von 4 Extrabanden, die nach Nukleoidsedimentation aus Thymuszellen von Ratten nach GKB mit 760 cGy sichtbar gemacht worden waren, ergab einen Mittelwert von $0,0284 \pm 0,0054$ mg/ml, was etwa 4,5% der pro Gradient insgesamt aufgetragenen DNA-Menge entsprach. Wurde andererseits der üblichen Zellkonzentration (15×10^6 Zellen/ml) reine, hochmolekulare Kalbsthymus-DNA zugesetzt, erschien bei der Nukleoidsedimentation eine im UV-Licht ebenfalls fluoreszierende Zone, die nach Lage, Aussehen und Form mit jener vergleichbar war, die einige Stunden nach hochdosierter GKB unter sonst identischen Aufarbeitungsbedingungen nachgewiesen wurde.

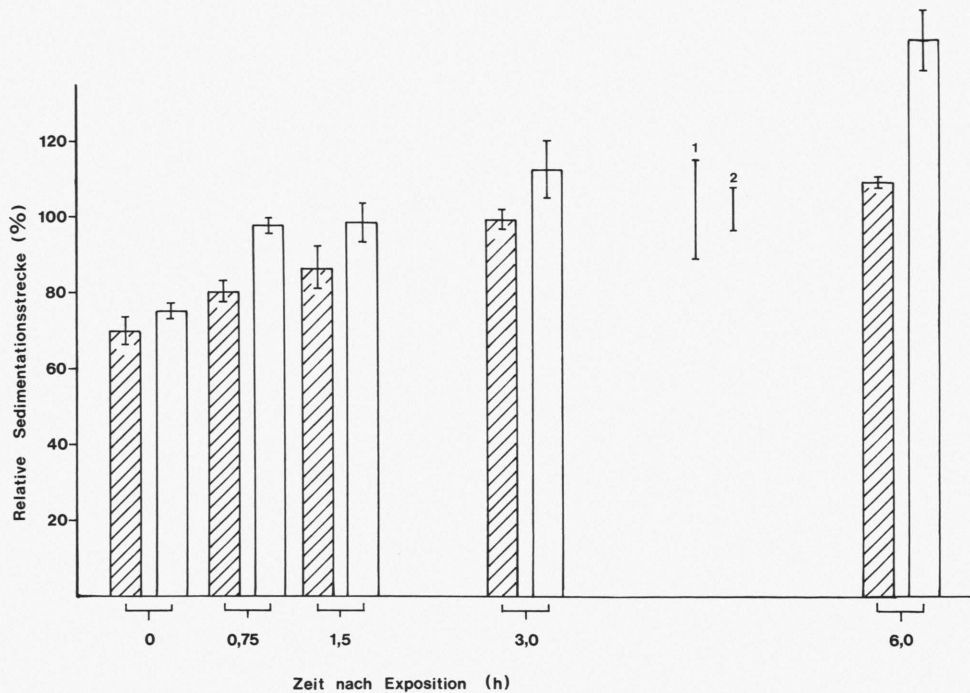


Abb. 1. Sedimentation von Milz- und Thymusnukleotiden von Ratten nach GKB mit 760 cGy zeitabhängig. Sedimentationsstrecke in Prozent der Sedimentationsstrecke von scheinbestrahlten Kontrolltieren mit Standardabweichung ($n = 3$). Symbole: schräg schraffiert: Milznukleotide, weiß: Thymusnukleotide. Strecken 1 bzw. 2: Standardabweichungen der Milz- bzw. Thymuskontrollen.

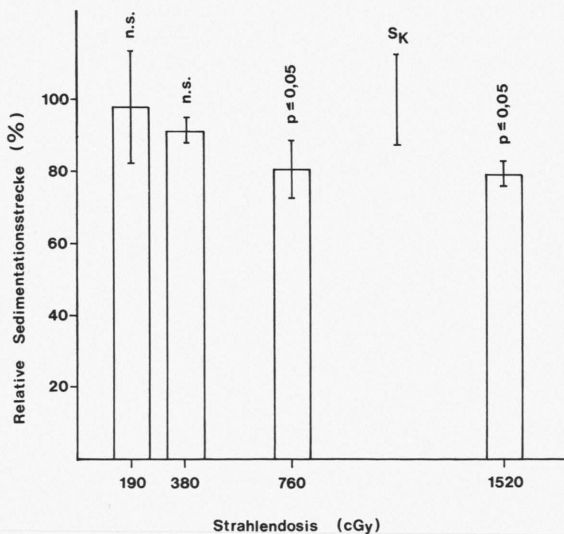


Abb. 2. Sedimentation von Thymusnukleotiden von Ratten nach GKB dosisabhängig; sofortige Organentnahme. Ordinate: Sedimentationsstrecke in Prozent der Sedimentationsstrecke scheinbestrahlter Kontrolltiere mit Standardabweichung; $n = 3$ (760 cGy), $n = 4$ (380 und 1520 cGy), $n = 6$ (190 cGy). S_K : Standardabweichung der Kontrollen ($n = 4$).

Tab. I. Extrabanden der Thymusnukleotide von Ratten nach GKB mit 380–1520 cGy im ethidiumbromidhaltigen Saccharosegradienten. Organentnahme 6 h nach Strahlenexposition. — In den Spalten 2 bzw. 3 der Tabelle sind der Abstand der Extrabanden vom oberen Flüssigkeitsmeniskus bzw. die Bandenbreite — jeweils mit Standardabweichung — aufgeführt.

Strahlendosis [cGy]	Bandenabstand [cm]	Bandenbreite [cm]	n
380	$0,27 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,05$	9
760	$0,40 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,03$	12
1520	$0,5 \pm 0,11$	$0,36 \pm 0,05$	6

3. Nukleoidsedimentation 24 h nach GKB

Strahlendosen < 190 cGy (23,75; 47,5; 95 cGy) konnten auch dann nicht signifikant nachgewiesen werden, wenn Thymus und Milz erst 24 h nach Strahlenexposition entnommen worden waren. Thymusnukleotide von Kontrollen und den o.a. Dosisgruppen beispielsweise wiesen Sedimentationsstrek-

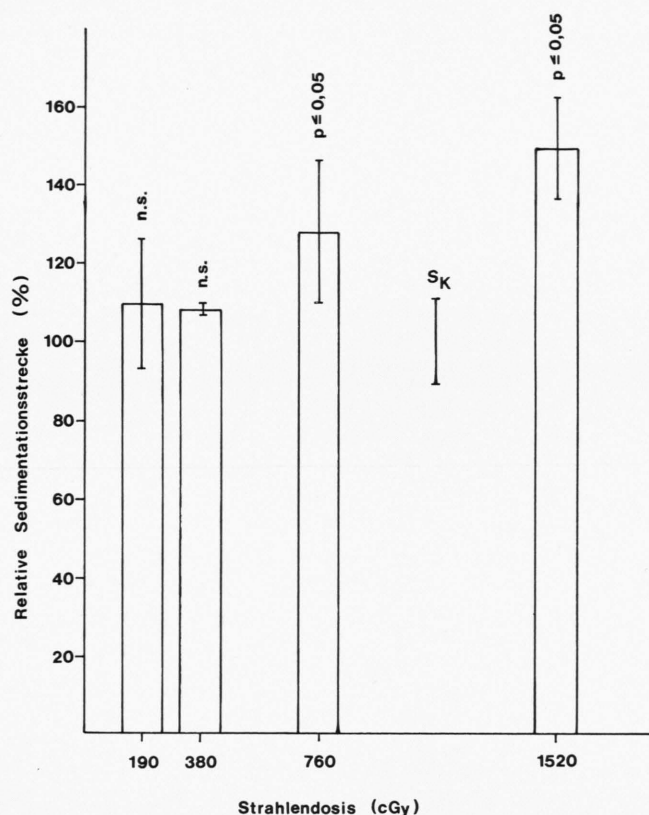


Abb. 3. Sedimentation von Thymusnukleoiden von Ratten nach GKB dosisabhängig; Organentnahme 6 h nach Strahlenexposition. Ordinate: Sedimentationsstrecke in Prozent der Sedimentationsstrecke scheinbestrahlter Kontrolltiere mit Standardabweichung; $n = 2$ (190 cGy), $n = 3$ (380 cGy), $n = 4$ (760 cGy), $n = 3$ (1520 cGy). S_K : Standardabweichung der Kontrollen ($n = 4$).

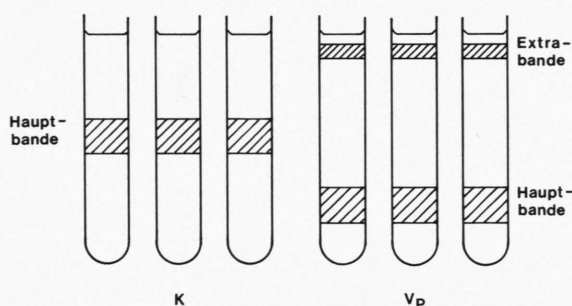


Abb. 4. Sedimentation von Thymusnukleoiden von Ratten nach GKB mit 760 cGy; Organentnahme 6 h nach Strahlenexposition. Schemazeichnung: K: Kontrollen, V_p : Versuchsproben.

ken von $3,05 \pm 0,67$, $2,7 \pm 0,04$, $3,18 \pm 0,6$ bzw. $2,61 \pm 0,41$ cm auf. Nach höheren Strahlendosen verminderte sich die Zellzahl der Organe so sehr, daß die für die Analyse erforderliche Zellkonzentration je Tier nicht mehr gewährleistet war.

4. Ursachen erhöhter Nukleoidsedimentation nach GKB

Da bei Einstellung von Zellsuspensionen zur Nukleoidsedimentation nur mikroskopisch intakte Zellen berücksichtigt werden, einige Stunden nach relativ hochdosierter Strahlenexposition aber vermehrt DNA aus nekrotischen Zellen in der Zellsuspension auftritt (Tab. II), wurde zunächst geklärt, welchen Einfluß ein unterschiedlicher Zell- bzw. DNA-Ge-

Tab. II. DNA-Konzentrationen (in $\mu\text{g/ml}$) der auf 15×10^6 intakte Zellen/ml eingestellten Kontroll- und Versuchsproben von Ratten 6 h nach Strahlenexposition.

Strahlendosis [cGy]	Versuchsproben (A)	Kontrollproben (B)	A/B
190	168	135	1,24
380	328	192	1,71
760	621	177	3,51
1520	724	160	4,52

halt auf die Sedimentationsstrecke der Nukleotide ausübt. Zellsuspensionen mit 10×10^6 , 20×10^6 bzw. 40×10^6 Thymuszellen/ml wurden in der üblichen Weise auf die Gradienten aufgetragen, lysiert und zentrifugiert. Mit Sedimentationsstrecken von 2,43, 2,47 bzw. 2,7 cm ergab sich, daß eine gegenüber dem Kontrollansatz vierfach höhere DNA-Konzentration lediglich eine etwa 10prozentige Erhöhung der Nukleoidsedimentation bewirkte. Da dieser Wert deutlich unter dem Grad der Sedimentationsbeschleunigung der 6 h nach hochdosierter GKB gewonnenen Nukleotide liegt, reicht die Erhöhung der DNA-Konzentration nicht aus, um das Phänomen zu erklären.

Als weitere Ursache war an strahleninduzierte DNA-DNA- und/oder DNA-Protein-Vernetzungen („cross-links“) zu denken. Letztere ließen sich durch Zusatz von Proteinase K in Konzentrationen von 0,5 und 4 mg/ml zur Nukleoidpräparation hochdosiert röntgenbestrahlter Tiere (Organentnahme 6 h nach GKB) bestätigen (Abb. 5). Die Erhöhung der Nukleoidsedimentation einige Stunden nach hochdosierter Strahleneinwirkung ist somit nahezu quantitativ über verstärkte Freisetzung von DNA aus nekrotischen Zellen und über DNA-Protein-Vernetzungen zu erklären (Tab. 2, Abb. 5).

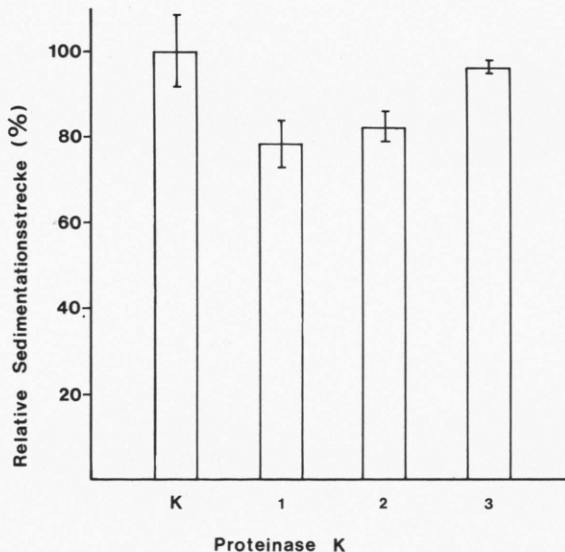


Abb. 5. Sedimentation von Thymusnukleoiden von Ratten nach GKB mit 760 cGy; Organentnahme 6 h nach Strahlenexposition. Ordinate: Sedimentationsstrecke von mit Proteinase K behandelten Nukleoiden in Prozent der Sedimentationsstrecke nicht-enzymbehandelter Proben (K, $3,3 \pm 0,31$ cm) mit Standardabweichung ($n = 3$). Versuche Nr. 1, 2 bzw. 3: 0,5, 4 bzw. 10 mg Proteinase K pro ml Zellysat.

Diskussion

Subletale und letale Dosen ionisierender Strahlen führen in lymphatischen Organen, wie Thymus und Milz, zu zahlreichen morphologischen und biochemischen Veränderungen, deren Ablauf für das Bild des „Interphasetodes“ charakteristisch ist (Literaturübersicht s. etwa unter *l.c.* [12]). Als Zeichen des Zelluntergangs zeigen sich bereits in der Frühphase der zellulären Strahlenreaktion u. a. Kernpyknosen, Zellfragmente (apoptotische Körperchen) und Chromatinabbau mit vermehrtem Auftreten von Nukleosomen (und ihren Oligomeren), freier DNA und Desoxyribopolynukleotiden. Für Aussagen zum Mechanismus des „Interphasetodes“ sind somit vor allem die ersten Stunden nach Strahlenexposition von Interesse.

Wurden Thymus- und Milzzellen der Ratte *in vitro* (bei 0 °C) röntgenbestrahlt und unmittelbar anschließend aufgearbeitet, hatten noch Strahlendosen ≥ 25 –50 cGy eine signifikante Verminderung der Nukleoidsedimentation zur Folge [9, 12]. Der gleiche Effekt zeigte sich an Thymus- und Milzzellen ganzkörperstrahlter Tiere (*In-vivo*-Exposition) erst nach der 15- bis 20fach höheren Strahlendosis (Abb. 1 und 2). Diese scheinbare Diskrepanz zwischen *In-vitro*- und *In-vivo*-Effekten findet ihre Erklärung in der Feststellung, daß die Tiefendosis-kurve der 60-kV-Röntgenstrahlung [13] – für Thymus und Milz gleichermaßen – einen rund 50prozentigen Dosisleistungsabfall erwarten läßt und daß Ganzkörperbestrahlung den Zellen bis zu ihrer Gewinnung einen beträchtlichen Spielraum für DNA-Reparaturvorgänge bietet. In diesem Zusammenhang sei daran erinnert, daß z. B. strahleninduzierte DNA-Einzelstrangbrüche mit Halbwertszeiten in der Größenordnung von wenigen Minuten repariert werden ([14, 15] u. a.). – Werden dagegen die im Zusammenhang mit dem „Interphasetod“ in Thymus- und Milzzellen ablaufenden sekundären morphologischen und biochemischen Veränderungen abgewartet [12, 16, 17], läßt sich mit Hilfe der Nukleoidsedimentation noch eine Strahlendosis im Bereich von ≥ 190 cGy aus dem Auftreten einer – nur im ethidiumbromidhaltigen Gradienten sichtbaren – Nukleoid- bzw. DNA-Zone besonders niedriger Sedimentierbarkeit nachweisen (Abb. 4), welche den von zahlreichen Autoren untersuchten und bestätigten – überwiegend enzymatischen – Abbau des Chromatinkomplexes in Verbindung mit der Bildung freier

DNA bzw. von Desoxyribopolynukleotiden (s. dazu etwa *l.c.* [12, 16–19]) widerspiegelt.

Angesichts der in den ersten Stunden nach GKB in Thymus und Milz ablaufenden – vorwiegend katabolen – Prozesse muß die Verlängerung der Sedimentationsstrecke der Nukleoidhauptbande (Abb. 3 und 4) überraschen. Während diese Erhöhung der Nukleoidsedimentation einige Stunden nach GKB nahezu quantitativ über verstärkte Freisetzung von DNA aus nekrotischen (lichtmikroskopisch als pyknotisch zu bezeichnenden) Zellen und Bildung von DNA–Protein-Vernetzungen („cross-links“) erklärt werden kann (Tab. II, Abb. 5), ist die Frage nach dem Mechanismus der Bildung solcher „cross-links“ und ihrer pathogenetischen Bedeutung aufgrund der vorliegenden Untersuchungen zunächst nicht zu beantworten. DNA–Protein-Vernetzungen gehören – neben DNA-Einzel- und -Doppelstrangbrüchen – zu den unmittelbarsten molekularen Effekten ionisierender Strahlen auf die Zelle [20–22]. An gamma-bestrahlten Zellen des Chinesischen Hamsters z.B. ergab sich, daß in einem Dosisbereich von 0–100 Gy mit 150 DNA–Protein-Vernetzungen pro 1 Gy absorbiertener Energiedosis zu rechnen ist [22]. Ihre Reparatur verläuft – verglichen mit der Reparatur von DNA-Strangbrüchen – verhältnismäßig langsam [20]. Da sich die Proteinase K – Empfindlichkeit der Thymus- (und Milz-)Nukleotide in den vorliegenden Versuchen allerdings erst im Zusammenhang mit den durch den Interphasetod sekundär bedingten morphologischen und biochemischen Reaktionen – d.h. in den ersten Stunden nach Exposition – einstellte, wird man in den nachgewiesenen DNA–Protein-Vernetzungen weniger den Ausdruck eines unmittelbaren Strahleneffekts als das Ergebnis von DNA–Protein-Wechselwirkungen im Zusammenhang mit dem enzymatischen Chromatin-Ab- und -Umbau nekrotischer oder nekrobiotischer Zellen sehen. Analog deuteten z.B. Chiu *et al.* [20] die Zunahme von DNA–Protein-„cross-links“ in Zellen des Chinesischen Hamsters während der ersten Stunden nach Bestrahlung mit UV-Licht: „Possibly, the increase in cross-linked DNA with time after UV irradiation represents attempted but unsuccessful rearrangements of chromatin which trap additional DNA into protein complexes“ [20]. An Zellen der gleichen Spezies zeigten sich strahleninduzierte Vernetzungen zwischen der DNA und nukleären Matrix-Proteinen bevorzugt im Bereich transkriptionsaktiver Gen-Sequenzen [23], was die Möglich-

keit eines sekundären, enzymatischen Mechanismus der Bildung von DNA–Protein-„cross-links“ nach Strahleneinwirkung unterstreicht.

Während die Bildung von DNA–Protein-Vernetzungen in Thymus- und Milzzellen einige Stunden nach Strahlenexposition pathogenetisch als Bestandteil (Nekrolyse) der geweblichen Reaktion bzw. Reparation gesehen werden kann und zeitlich begrenzt ist (kein Nachweis von „cross-links“ 24 h nach GKB mit 24–95 cGy), gehen die meisten Autoren von der Annahme aus, daß die Persistenz von DNA–Protein-„cross-links“ die Chromatinfunktionen einschränkt und die zytoletalen bzw. transformierenden Wirkungen ionisierender Strahlung verstärkt [20, 21, 24].

Aus den vorliegenden Untersuchungen ergeben sich folgende

Schlußfolgerungen

Unmittelbar nach GKB vermindert sich die superhelikale DNA-Struktur von Thymozyten und Milzzellen. Im Sedimentationsverhalten von Nukleoiden wird diese Veränderung erst nach sub- bis mittelletalen Dosen deutlich und spiegelt die bis zum Analysezeitpunkt nicht reparierten Strangbrüche wider. Im weiteren Verlauf der zellulären bzw. geweblichen Strahlenreaktion werden DNA-Abbauprodukte und DNA–Protein-Vernetzungen („cross-links“) nachweisbar. Erstere manifestieren sich als Nukleoidbande besonders geringer, letztere als (Proteinase-K-sensible) Nukleoidzone besonders hoher Sedimentierbarkeit. Eine funktionelle Verknüpfung beider Phänomene kann darin gesehen werden, daß es sich bei den über „cross-links“ an die DNA gebundenen Proteinen bevorzugt um Nekrolyseenzyme, z.B. um Desoxyribonukleasen, handelt, welche in den nekrotischen bzw. nekrobiotischen Zellkernen teils an die DNA gebunden bleiben, teils zu Abbauvorgängen mit der Freisetzung von DNA bzw. Desoxyribopolynukleotiden aus dem Chromatinkomplex führen. Inwieweit der Bildung von DNA–Protein-Vernetzungen eine spezifische Funktion im Mechanismus des Interphasetodes lymphatischer Zellen zukommt, muß Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben. Da Änderungen im Sedimentationsverhalten von Nukleoiden nach Strahleneinwirkung *in vivo* offensichtlich relativ hohe Dosen voraussetzen, scheidet die Methode in ihrer gegenwärtigen Form als Bioindikator von Strahlenexpositionen aus.

- [1] P. R. Cook und I. A. Brazell, *J. Cell Sci.* **19**, 261–279 (1975).
- [2] P. Weniger, *Progr. Mutat. Res.* **4**, 261–265 (1982).
- [3] M. R. Mattern, The relation of three-dimensional DNA structure to DNA repair as studied by nucleoid sedimentation, S. 35–50, in: *DNA repair and its inhibition* (A. Collins, C. S. Downes und R. T. Johnson, Hrsg.), IRL Press, Oxford, Washington 1984.
- [4] P. Weniger, *Int. J. Radiat. Biol.* **36**, 197–199 (1979).
- [5] K. Langrock, *Radiobiol. Radiother.* **23**, 301–308 (1982).
- [6] L. H. F. Mullenders, A. A. VanZeeland und A. T. Natarajan, *Mutat. Res.* **112**, 245–252 (1983).
- [7] P. E. Bryant, R. Warring und G. Ahnström, *Mutat. Res.* **131**, 19–26 (1984).
- [8] E. J. Van Rensburg, W. K. A. Louw, H. Izatt und J. J. Van Der Watt, *Int. J. Radiat. Biol.* **47**, 663–679 (1985).
- [9] K. Tempel, I. Schmerold und B. Kläger, *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **98**, 3–7 (1985).
- [10] P. D. Lipetz, D. E. Brash, L. B. Joseph, H. D. Jewett, D. R. Lisle, L. E. Lantry, R. W. Hart und R. E. Stephens, *Analyt. Biochem.* **121**, 339–348 (1982).
- [11] K. Tempel und A. Spath, *Arch. Toxicol.* **60**, 287–292 (1987).
- [12] R. Heinzelmann, *Diss. med. vet.*, München 1987.
- [13] E. Bunde, Strahlenschutz – Physikalisch-technische Grundlagen, praktische Maßnahmen und gesetzliche Vorschriften, S. 362–378, in: *Radiologie I*, 3. Aufl., bearb. von J. Lissner, Enke, Stuttgart 1986.
- [14] G. P. Van Der Schans, H. B. Centen und P. H. M. Lohmann, *Progr. Mutat. Res.* **4**, 285–299 (1982).
- [15] G. P. Van Der Schans, M. C. Paterson und W. G. Cross, *Int. J. Radiat. Biol.* **44**, 75–85 (1983).
- [16] D. Suciú, *J. Theor. Biol.* **105**, 391–401 (1983).
- [17] H. Ohyama, T. Yamada, A. Ohkawa und I. Watanabe, *Radiat. Res.* **101**, 123–130 (1985).
- [18] J. Matyášová, M. Skalka und M. Cejková, *Fol. Biol. (Praha)* **30**, 123–136 (1984).
- [19] E. A. Borisova, A. B. Chukhlovín, A. A. Seiliev, E. A. Zherbin, B. D. Zhivotovsky und K. P. Hanson, *Int. J. Radiat. Biol.* **51**, 421–428 (1987).
- [20] S.-M. Chiu, N. M. Sokany, L. R. Friedman und N. L. Oleinick, *Int. J. Radiat. Biol.* **46**, 681–690 (1984).
- [21] C. M. Arundel und P. J. Tofilon, *Radiat. Res.* **110**, 294–304 (1987).
- [22] N. Ramakrishnan, S.-M. Chiu und N. L. Oleinick, *Cancer Res.* **47**, 2032–2035 (1987).
- [23] S.-M. Chiu, L. R. Friedman, N. M. Sokany, L.-Y. Xue und N. L. Oleinick, *Radiat. Res.* **107**, 24–38 (1986).
- [24] S. Iwasaki, H. Tanaka und M. Arima, *Radiat. Res.* **110**, 72–83 (1987).