

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

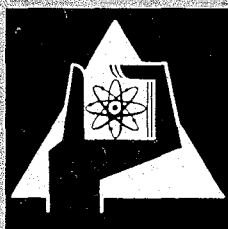
Oktober 1967

KFK 676

Institut für Strahlenbiologie

Über die Strahlenempfindlichkeit der
Desoxyribonukleinsäure im Nukleoprotein

H. Weinert



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.
KARLSRUHE



Kernforschungszentrum Karlsruhe

Oktober 1967

KFK 676

Institut für Strahlenbiologie

Über die Strahlenempfindlichkeit der Desoxyribonukleinsäure
im Nukleoprotein

Heide Weinert

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|--|-------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Material und Methoden | 5 |
| 2.1. Isolierung des Desoxyribonukleoproteins | 5 |
| 2.2. Charakterisierung des Nukleoproteins | 6 |
| 2.3. Das Nukleoprotein als Gel | 8 |
| 2.4. Bestrahlung | 8 |
| 2.5. Die Isolierung der DNS | 8 |
| 2.6. Charakterisierung der DNS-Präparation | 9 |
| 2.7. Bestimmung des Molekulargewichtes nativer und denaturierter DNS | 9 |
| 2.8. Bestimmung des Schmelzpunktes der DNS-Lösungen | 16 |
| 3. Ergebnisse | 16 |
| 3.1. Charakterisierung des Nukleoproteins | 16 |
| 3.2. Einfluß verschiedener Isolierungsmethoden auf die Qualität der DNS | 17 |
| 3.3. Veränderungen des Molekulargewichtes nach Bestrahlung | 18 |
| 3.3.1. Bruchwahrscheinlichkeit | 18 |
| 3.3.2. Bestimmung von möglichen Vernetzungen | 20 |
| 3.4. Schmelzpunktbestimmungen | 23 |
| 4. Diskussion | 23 |
| 5. Zusammenfassung | 30 |
| 6. Literaturverzeichnis | 31 |

1. Einleitung

Über die Wirkung ionisierender Strahlen auf die isolierte DNS liegen viele Untersuchungen vor. Dabei wurde vor allem die DNS in wässriger Lösung bestrahlt, aber auch in trockener Form oder als Gel. Bei der Bestrahlung von trockener DNS wird nur die in den einzelnen DNS-Molekülen absorbierte Energie wirksam. Dagegen sind Strahlenschäden, die bei Bestrahlung von DNS-Gelen oder -Lösungen auftreten, hauptsächlich auf die im Wasser entstehenden Radikale und Peroxyde zurückzuführen, was als indirekte Strahlenwirkung bezeichnet wird. Auf Grund dieser indirekten Wirkung wird die DNS, die in wässriger Lösung oder als Gel bestrahlt wird, schon durch viel geringere Dosen geschädigt als trockene DNS.

Die wichtigsten durch Strahlen induzierten DNS-Veränderungen sind Brüche in den Nukleotidketten, Basenveränderungen, Aufbrechen der Wasserstoffbrücken und Vernetzungen (BUTLER (1959, WEISS (1964))). Brüche können sowohl im Einzelstrang (Einzelbrüche) als auch in beiden Nukleotidketten (Doppelbrüche) auftreten. Einzelbrüche können erfaßt werden, wenn man die beiden Einzelstränge durch Denaturierung trennt. Die Zahl der strahleninduzierten Einzel- und Doppelbrüche pro DNS-Molekül können mit Hilfe von Molekulargewichtsbestimmungen für native und denaturierte DNS ermittelt werden (HAGEN (1967)). Basenschädigungen treten in Form von Desaminierungen, Dehydroxylierungen und Ringspaltungen auf. Brüche in den Nukleotidketten und Basenschäden führen dazu, daß auch die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Nukleotidsträngen auseinanderbrechen. Wie verschiedene Kriterien ergaben (HAGEN u. WILD (1964)), wird die DNS durch die Bestrahlung zunehmend denaturiert. Neben Brüchen der Nukleotidstränge und Schädigung der Basenstruktur ist weiter mit Vernetzungen zu rechnen. Sie entstehen durch Zusammenlagern der in der DNS entstandenen Makroradikale.

Solche Vernetzungen wurden vor allem nach Bestrahlung von trockener DNS (HAGEN u. WELLSTEIN (1965)) und von DNS-Gelen (LETT u. ALEXANDER (1961)) gefunden. Aber auch nach Bestrahlung von wässriger DNS-Lösung werden Vernetzungen beobachtet (HAGEN (1967)).

Neben der Wirkung ionisierender Strahlen auf die DNS in vitro, interessiert aber vor allem die Strahlenwirkung auf die DNS in der lebenden Zelle. Es ist jedoch hier schwierig, strahlenbedingte Veränderungen der DNS nachzuweisen, da nachträglich bei der Isolierung der DNS aus den Zellen oder bei der Trennung der DNS vom Protein Schäden an der DNS-Struktur kaum vermieden werden können. Vor allem ist die Degradierung der DNS durch die Desoxyribonuklease in den hochbestrahlten Zellen nicht auszuschließen. Außerdem ist noch zu berücksichtigen, daß die isolierten DNS-Moleküle relativ klein sind gegenüber der Größe des gesamten Genoms. Es müssen also sehr hohe Dosen, weit über der mittleren Letaldosis gegeben werden, um deutliche Strahleneffekte zu sehen.

Erst in letzter Zeit ist es gelungen, Informationen über die Bedeutung von Strukturveränderungen an der DNS für den allgemeinen Strahlenschaden der Zelle zu erhalten. Bei Bakteriophagen kann das gesamte Genom als ein Molekül isoliert werden und somit auch die Zahl der durch Bestrahlung eingetretenen Brüche festgestellt werden. FREIFELDER (1965) verglich diese Bruchrate mit der Inaktivierung der Phagen und findet, daß nur 40 % der Phagen durch einen Bruch der Doppelhelix inaktiviert sein können, die übrigen werden durch andere Prozesse an der Vermehrung gehindert. Bei Bakterien wurden ähnlicher Weise die Zahl der Einzelbrüche mit der Inaktivierung verglichen (KAPLAN (1967)).

Eine Änderung der biologischen Aktivität der DNS kann festgestellt werden, indem man die Transformation bestimmter genetischer Eigenschaften prüft. Nach Bestrahlung der Bakterien wurde an der aus ihnen isolierten DNS eine Ab-

nahme der Fähigkeit zur Transformation festgestellt (HUTCHINSON u. ARENA (1960), STUY (1960)). Durch Bestrahlung trockener und feuchter Bakterien ergab sich, daß die Strahlenschäden der DNS etwa zu einem Drittel durch direkte Energieabsorption in der DNS und zu zwei Drittel durch diffusible Radikale aus einer Umgebung von 10 \AA bedingt sind. Welche DNS-Veränderungen findet man aber nach Bestrahlung von Säugetierzellen, in denen die DNS von einem Histonmantel umgeben ist? Wir versuchten mit unserer Arbeit an der Beantwortung dieser Frage mitzuwirken, indem wir Nukleoprotein als Gel in vitro bestrahlten. Diese Versuchsbedingungen entsprechen annähernd den Verhältnissen wie sie in der lebenden Säugetierzelle anzutreffen sind.

Die Struktur des Nukleoproteins haben LUZZATI und NICOLAIEFF (1963) mit Hilfe der Röntgenbeugung eingehend untersucht: Sie zeigten, daß die DNS-Moleküle in wässriger Lösung niemals zusammengelagert sind, sondern daß zwischen den einzelnen DNS-Molekülen das Wasser gleichmäßig verteilt ist. Dagegen war die Anordnung der DNS-Moleküle im Nukleoprotein bzw. -histon je nach Wassergehalt eine andere. Bei einer Konzentration von 0,005 bis 0,20 (isotrope Phase) sind mehrere, meist vier DNS-Moleküle in Gruppen angeordnet, von Histon umgeben mit einem Durchmesser von etwa 120 \AA . Paarweise liegen die DNS-Moleküle dagegen bei einer Konzentration von 0,30 - 0,50 (ω -Phase). Der sie umgebende Histonmantel hat einen Durchmesser von 54 \AA . Die Anordnung der Moleküle ist hexagonal bei Konzentrationen zwischen 0,52 und 0,70 (ψ -Phase). Die Zwischenräume sind mit Wasser und Histon ausgefüllt. Die Verhältnisse in der Zelle entsprechen wohl am meisten der ω - und der ψ -Phase. Insbesondere von WILKINS u.a. (1959) sowie ZUBAY und WILKINS (1962) wurde gezeigt, daß jedes DNS-Molekül im isolierten Nukleoprotein von einem Histonmantel umgeben ist. Andere Autoren weisen allerdings darauf hin, daß diese Befunde nicht

ohne weiteres auf die Verhältnisse in der lebenden Zelle übertragen werden dürfen, und daß hier jeweils mehrere Moleküle zusammengelagert sind (OLINS u.a. (1967), LUZZATI u. NICOLAIEFF (1963)). Eine Gelfeuchtigkeit, die zwischen der ω - und ψ -Phase liegt, erschien uns deshalb am ehesten geeignet, die Verhältnisse in der lebenden Zelle nachzuahmen. Wir bestrahlten somit unser Nukleoprotein bei einer Konzentration von etwa $0,53 \pm 0,01$.

Die Wirkung der ionisierenden Strahlen auf die Nukleoproteinstruktur ist verschiedentlich untersucht worden (BERNSTEIN (1954), PEACOCKE u. PRESTON (1961), EMMERSON, SCHOLES u.a. (1960), LLOYD u. PEACOCKE (1963), WEISS (1964)). Schon bei geringen Dosen findet man eine deutliche Abnahme der Viskosität. Nähere Untersuchungen zeigten, daß dabei zunächst die Histone von der DNS abdissoziieren, wobei die DNS anfänglich gar nicht oder nur gering geschädigt wird. Höhere Dosen führen dann zu einem raschen Abbau der DNS-Ketten. EMMERSON, SCHOLES u.a. (1960) untersuchten DNS-Veränderungen nach Bestrahlung von Nukleoproteinlösungen durch Bestimmung der Freisetzung anorganischen Phosphats. Es konnte aber kein Unterschied zu den nicht bestrahlten Proben bemerkt werden. Sie folgerten, daß die durch Bestrahlung im Wasser entstehenden Radikale vom Protein abgefangen werden und nicht bis zur DNS vordringen können. Bis zu Bestrahlungsdosen von 10^5 rad traten keine wesentlichen DNS-Veränderungen auf. Untersuchungen von TSCHAHITSCHI (1966) über die Empfindlichkeit der Wasserstoffbrücken in der DNS nach Bestrahlung von verdünnter Nukleoproteinlösung (0,2 mg DNS/ml) zeigten, daß der Proteinhülle die DNS vor Strahlenschäden ungefähr um einen Faktor 10 schützt.

Diese Untersuchungen geben uns jedoch noch keinen Hinweis, ob nach Bestrahlung eines Nukleoproteins andersartige Reaktionen an der DNS eintreten als nach Bestrahlung von verdünnten DNS-Lösungen. Um den Strahleneffekt auf die

DNS im Chromatin besser beschreiben zu können, untersuchten wir deshalb einige charakteristische Veränderungen, wie die Entstehung von Brüchen der Doppelhelix oder des Einzelstranges sowie die Entstehung von Vernetzungen. Hydrodynamische Methoden, wie die Bestimmung der Viskosität und der Sedimentation geben hierüber Aufschluß. Weiter sollten Schmelzpunktbestimmungen uns über die Stabilität der Wasserstoffbrücken in der DNS nach Bestrahlung von Nukleoprotein-Gel Auskunft geben.

2. Material und Methoden

2.1. Isolierung des Desoxyribonukleoproteins

2.1.1. Isolierung des Nukleoproteins aus Kalbsthymus, modifiziert nach LUZZATI und NICOLAIEFF (1963)

5 g Kalbsthymus wird zerkleinert, mit 50 ml 0,14 M NaCl + 0,002 M Na-EDTA vorsichtig homogenisiert und 10 Minuten bei 5 000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Sediment wird noch dreimal mit 50 ml 0,14 M NaCl + 0,002 M Na-EDTA homogenisiert und zentrifugiert. (Das letzte Mal bei 15 000 Upm).

Das Sediment wird in 50 ml 1 M NaCl aufgenommen und unter gelegentlichem Umrühren etwa 1 Stunde bei 4 °C stehengelassen. Dabei löst sich der größte Teil des Sediments. Dann wird 30 Minuten bei 15 000 Upm zentrifugiert.

Der Überstand wird mit kaltem aqua dest. auf 0,14 M NaCl gebracht. Die dadurch ausgefällten Nukleoprotein-fäden werden in Alkohol gewaschen, in Aceton und Äther getrocknet.

2.1.2. Umfällung des Nukleohistons (Worthington)

"Nucleohiston" der Worthington B.C. wird nach Angaben der Firma nach ZAMENHOF (1957) isoliert und aus einer 2 M NaCl-Lösung lyophilisiert. Um dies anwesende Salz zu entfernen, werden etwa 200 mg Nukleohiston in 80 ml 1 M NaCl über Nacht aufgelöst und mit kaltem aqua dest.

auf 0,14 M NaCl gebracht. Die ausgefällten Nukleoproteinfäden werden in Alkohol gewaschen und mit Aceton und Äther getrocknet.

2.2. Charakterisierung des Nukleoproteins

Die Charakterisierung des Nukleoproteins erfolgt durch Bestimmung des Gehaltes an DNS, RNS, Histon und saurem Protein. Als Ausgangslösung für die folgenden Bestimmungen (Ausnahme: RNS-Bestimmung) dient eine Lösung von 2 mg/ml umgefälltem Nukleoprotein in $1 \cdot 10^{-4}$ M Na-EDTA.

2.2.1. DNS-Bestimmung nach DISCHE (1930), modifiziert nach BURTON (1956)

Zu 1 ml Nukleoproteinlösung von 0,2 mg/ml in 0,005 N NaOH werden 2 ml Reagens pipettiert, gut gemischt, 17 Stunden bei 30 °C inkubiert und bei 600 nm photometriert.

Dische-Reagens: 0,75 g Diphenylamin
 50,00 ml Eisessig
 0,75 ml konz. Schwefelsäure

Der DNS-Gehalt pro ml wird von einer Eichkurve abgelesen.

2.2.2. Phosphatbestimmung nach P.S. CHEN u.a. (1956) zur Ermittlung des DNS-Gehaltes im Nukleoprotein

0,05 ml Nukleoproteinlösung werden mit 0,05 ml einer 10 % alkohol. $Mg(NO_3)_2$ -Lösung versetzt und erhitzt, bis die zuerst braunen Dämpfe weiß werden. 0,3 ml 1 N HCl werden zugegeben, 15 Minuten gekocht, und nach dem Abkühlen mit 1,7 ml aqua dest. und 2 ml Chen-Reagens versetzt und gut gemischt.

Chen-Reagens: 1 Teil 6 N Schwefelsäure
 2 Teile aqua dest.
 1 Teil 2,5 % Ammoniummolybdat
 1 Teil 10 % Ascorbinsäure

Nach 1 - 2 Stunden bei 37 °C wird bei 820 nm photometriert. Auf der Eichkurve wird der μmol Phosphorgehalt/Ansatz abgelesen und daraus die DNS-Konzentration in der Nukleoproteinlösung berechnet.

2.2.3. Bestimmung des Proteingehaltes der Nukleoproteinlösung

Durch Säureextraktion des Nukleoproteins können die Histone vom sauren Protein getrennt werden.

9 ml Nukleoproteinlösung werden mit 9 ml 0,2 N HCl versetzt, im Glashomogenisator fein verteilt und 10 Minuten bei 5 000 Upm zentrifugiert.

Der Überstand I, der die meisten Histone enthält, wird aufbewahrt, das Sediment wird mit 0,1 N HCl nochmals im Glashomogenisator fein verteilt und zentrifugiert.

Der Überstand II wird wiederum aufbewahrt; das Sediment, das saure Protein, wird in 4,5 ml 0,1 N NaOH aufgelöst. Dies dauert etwa 30 Minuten.

Bei den drei Fraktionen: Überstand I, Überstand II und Sediment in 0,1 N NaOH wird der Proteingehalt nach LOWRY u.a. (1951) bestimmt.

Zur Kontrolle wird ebenfalls mit der Methode nach LOWRY (1951) der Gesamtproteingehalt der Nukleoproteinlösung bestimmt.

2.2.4. Bestimmung des Ribonukleinsäure-Gehaltes im Nukleoprotein mit Orcinol nach E. VOKIN u.a. (1954, 1957)

20 mg Nukleoprotein werden mit 4 ml 0,1 N NaOH versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen.

Dann etwa 1 Stunde geschüttelt und 30 Minuten bei 90 °C im Wasserbad gehalten. Dadurch wird die Viskosität der DNS erniedrigt, was den weiteren Arbeitsgang erleichtert.

Mit 0,48 ml 1 N HCl wird die Lösung auf pH 2 eingestellt, wobei die DNS ausfällt. Diese wird abzentrifugiert (10 Minuten bei 5 000 Upm) und 1 ml des Überstandes mit 3 ml Orcinol-Reagens versetzt, 20 Minuten gekocht

und bei 660 nm photometriert.

Auf der Eichkurve kann dann der RNS-Gehalt in $\mu\text{g/ml}$ im Überstand abgelesen werden.

2.3. Das Nukleoprotein als Gel

Um das Nukleoprotein als Gel zu erhalten, muß es mehrere Tage in einer feuchten Kammer gehalten werden. Dazu dient ein Schliffröhrchen, in dem ein kleines Gefäß zur Aufnahme des Nukleoproteins (je 20 mg) eingebracht wird. Das Röhrchen ist zur Hälfte mit 9,33 % CaCl_2 -Lösung gefüllt; es wird nach Evakuieren mit N_2 gefüllt und 5 - 10 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Durch diese Behandlung nehmen im Mittel 20 mg Trockenpräparat $11,68 \pm 0,23$ mg Wasser auf. Unter Berücksichtigung des Wasser- und Salzanteiles Trockenpräparat (siehe Tab. 1) ergibt daraus eine Konzentration von $c = 0,532 \pm 0,0094$.

2.4. Bestrahlung

Die Bestrahlung des Nukleoproteins als Gel erfolgt mit einer Cobalt- γ -Quelle (Gammacell 220, Atomic Energy of Canada limited). Dosisleistung 1,6 Mrad/Stunde.

2.5. Die Isolierung der DNS

Das als Gel bestrahlte Nukleoprotein wird in 9 ml aqua dest. und 1 ml 0,001 M Na-EDTA über Nacht aufgelöst, mit 2 ml 0,5 M Trispuffer (pH 7,8) und 0,5 ml 0,25 % Trypsinlösung versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die DNS-Isolierung mit Phenol, modifiziert nach COLTER u.a. (1962) schließt sich an: Die Lösung wird mit 1,25 ml 5 % Desoxycholat und 1:1 mit 75 % Phenol versetzt, 10 Minuten gerührt und 30 Minuten bei 12 000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgezogen. Das in der DNS-Lösung gelöste Phenol wird durch 3 Ätherextraktionen entfernt, und der Äther im Rotationsverdampfer abgesaugt. Die DNS-Lösung wird über Nacht gegen 0,2 M NaCl (pH 7) bei 4°C dialysiert.

2.6. Charakterisierung der DNS-Präparation

Zur Charakterisierung der DNS-Präparation wird ihr Gehalt an DNS, RNS und Protein bestimmt.

Die Bestimmung der DNS-Konzentration erfolgt durch Messung der Extinktion bei 260 nm mit dem Spektralphotometer (Zeiss). Der nach dem Phosphatgehalt ermittelte Extinktionskoeffizient beträgt $2,2 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgt mit der Methode nach O.H. LOWRY u.a. (1951).

0,1 ml der DNS-Lösung wird mit 0,5 ml aqua dest. versetzt, 3 ml alkalische Kupfersulfatlösung (50 ml 2 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH und 1 ml 0,5 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ in 1 % Na-tartrat) zugegeben, gut durchmischt und 10 Minuten oder länger stehengelassen. 0,3 ml verdünntes Folin-Ciocalteus-Phenolreagens (1 N) wird schnell zugefügt und innerhalb 1 - 2 Sekunden gemischt. Nach 30 Minuten oder länger wird bei 691 nm photometriert.

Der Proteingehalt wird auf der Eichkurve abgelesen.

Die Bestimmung des RNS-Gehaltes in der DNS-Lösung erübrigt sich, da die Bestimmung des RNS-Gehaltes im Nukleoprotein nur sehr geringe Werte ergab (s. Tab. 1).

2.7. Bestimmung des Molekulargewichtes nativer und denaturierter DNS

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der DNS-Präparate erfolgt mit hydrodynamischen Methoden. Die native DNS ist dabei in 0,025 M Phosphatpuffer (pH 7,3) und 0,2 M NaCl gelöst. Zur Denaturierung wird die DNS für 3 Minuten auf 0,2 M NaOH gebracht, dann Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 2 % zugegeben und mit 1 M KH_2PO_4 neutralisiert.

2.7.1. Bestimmung der Viskosität $[\eta]$

Die Viskosität der DNS-Präparationen in wässriger Lösung wird mit dem Drehviskosimeter nach Hatschek-Couette bestimmt, dessen Schergradient $8,4 \text{ sec}^{-1}$ beträgt. Die gemessene Viskosität η wird zu der Viskosi-

tät des reinen Lösungsmittels η_L in Beziehung gesetzt und so die spezifische Viskosität η_{sp} ermittelt.

$$\eta_{sp} = \frac{\eta}{\eta_L} - 1 \quad (1)$$

Das Verhältnis der spezifischen Viskosität zur DNS-Konzentration $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)$ wird gegen die Konzentration (c) aufgetragen und auf die Konzentration 0 (Null) extrapoliert. Daraus ergibt sich die Viskosität bei unendlicher Verdünnung $[\eta]$:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} \text{ [ml/g]} \quad (2)$$

2.7.2. Bestimmung der Sedimentation bei nativer und denaturierter DNS

Die Sedimentation wird in der analytischen Ultrazentrifuge (Modell Spinco E, Beckman) mit Ultraviolett-optik bei 260 nm bestimmt. Die Umlaufgeschwindigkeit beträgt 29 500 Upm, mit Ausnahme einiger nativer Proben (Kontrollen, mit 0,5 Mrad bestrahlt), die bei 17 980 Upm zentrifugiert werden. Die Temperatur beträgt 20 °C. Die Konzentration der DNS wird entsprechend der Extinktion bei 260 nm so gewählt, daß bei einer Belichtungszeit von 20 sec eine lineare Beziehung zwischen der Schwärzung des Films und der DNS-Konzentration besteht. Die Filmschwärzung der Aufnahmen wird mit dem Mikrodensitometer Analytrol (Beckman) aufgezeichnet. Der Abstand des Gradienten von der Referenzlinie bei 50 % der Konzentration gibt den mittleren Sedimentationskoeffizienten S_{app} , der bei der jeweiligen Konzentration (c) erhalten wird. Die Sedimentationskonstante S^0 wird graphisch aus dem Verhältnis von $\frac{1}{S_{app}}$ zur Konzentration c durch Extrapolation auf unendliche Verdünnung ($c = 0$) ermittelt.

2.7.3. Molekulargewichtsbestimmungen aus S^0 , $[\eta]$ sowie aus der Molekulargewichtsverteilung

Viskosität und Sedimentation können allein oder zusammen für eine Bestimmung des Molekulargewichtes herangezogen werden. Während bei molekulareinheitlichen Proben alle Methoden den gleichen Wert ergeben, findet man bei polymolekularen Gemischen verschiedene Werte, die dann zur Charakterisierung der Uneinheitlichkeit benutzt werden können.

2.7.3.1. Aus der Sedimentationskonstanten S^0 läßt sich nach der Gleichung

$$S^0 = a_s \cdot M^{b_s} \quad (3)$$

das Molekulargewicht berechnen. Für native DNS gilt nach DOTY u.a. (1958): $a_s = 0,063$, $b_s = 0,37$.

Für denaturierte DNS wurde bei unseren Denaturierungsbedingungen gefunden: $a_s = 0,055$, $b_s = 0,38$.

Diese Konstanten ergaben sich in vergleichenden Messungen der Viskosität und der Ermittlung von $M_{s\eta}$ verschieden großer DNS-Präparate (vgl. Abb. 2).

Für die Ermittlung des Molekulargewichtes auf Grund der Viskosität gilt für native DNS nach EIGNER und DOTY (1965):

$$[\eta] = 6,9 \cdot 10^{-4} \cdot M_{\eta}^{0,70}, \text{ wobei } 2 \times 10^6 < M < 130 \times 10^6.$$

Für denaturierte DNS lagen keine zuverlässigen Konstanten vor.

Ist die Viskosität und Sedimentation einer DNS-Probe bekannt, so kann nach der Gleichung von MANDELKERN und FLORY (1952) das Molekulargewicht $M_{s\eta}$ der DNS ermittelt werden:

$$M = M_{s\eta} = \left[\frac{S^0 [\eta]^{\frac{1}{3}} \cdot N \cdot \eta_0 \cdot 10^{-13}}{\beta(1-V\rho)} \right]^{\frac{3}{2}} \quad (4)$$

- M = Molekulargewicht
S^o = Sedimentation bei unendlicher Verdünnung
[η] = Viskosität bei unendlicher Verdünnung
η_o = Viskosität des Lösungsmittels = 0,01 g cm⁻¹ sec⁻¹
V̄ = partielles, spezifisches Volumen der gelösten
DNS = 0,55 cm³/g
ρ = Dichte des Lösungsmittels = 1,01 g/cm³
β = ein experimenteller Wert, der für native und
denaturierte DNS in gewissen Molekulargewichts-
bereichen konstant ist:
für native DNS β = 2,5 x 10⁶
für denaturierte DNS β = 2,3 x 10⁶
N = 6,0235 x 10²³

Diese Gleichung gilt sowohl für native als auch für denaturierte DNS, unabhängig vom Lösungsmittel. Die nach dieser Gleichung berechneten Molekulargewichte stellen ein Mittel des Molekulargewichtes (M_{sη}) dar, das zwischen dem Zahlenmittel M_n und dem Gewichtsmittel M_w liegt.

2.7.3.2. Molekulargewichtsbestimmung aus der Molekulargewichtsverteilung

Neben dem Mittelwert des Molekulargewichtes interessiert die Größenverteilung der Moleküle in der entsprechenden DNS-Probe. Dazu wird der in der Zentrifugenzelle erhaltene Gradient in eine Sedimentationsverteilung umgewandelt, über die dann nach der von EIGNER und DOTY (1965) angegebenen Beziehung

$$S^o = a_s \cdot (M_{s\eta})^{b_s}$$

das Molekulargewicht bzw. die Molekulargewichtsverteilung erhalten werden kann.

Nach einem von SCHUMAKER und SCHACHMAN (1957) sowie von HAGEN (1967) angegebenen Verfahren wird zunächst aus dem mit dem Densitometer erhaltenen Gradienten mit dem Abstand x_i vom Meniskus und der Höhe y_i die

integrale Verteilung der Sedimentation S_i und c_i berechnet.

Diese S_i -Werte sind jedoch S_{app} -Werte, d.h. nur für die verwendete DNS-Konzentration gültig.

Um die Verteilung der S^0 -Werte zu erhalten, muß jeder S_i -Wert der S_{app} -Verteilung auf die Konzentration $c = 0$ extrapoliert werden nach der Gleichung

$$S_i^0 = S_{app_i} \left(1 + K_s [\eta]_i \cdot Kz \cdot \left(0,5 + \frac{c_i}{2} \right) \right), \quad (5)$$

wobei

K_s ein von EIGNER u.a. (1962) definierter Wert für die Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentation ist (= 0,80),

Kz : Ausgangskonzentration der DNS-Lösung in g/100 ml und

c_i : relative Konzentration am Gradienten.

$[\eta]_i$ ergibt sich aus der Beziehung zwischen S_i^0 und $[\eta]_i$, die von EIGNER und DOTY (1965) an Hand von Literaturdaten verschiedener DNS-Präparationen erhalten wurde.

In Abb. 1 ist diese Beziehung als ausgezogene Linie eingezeichnet, die angegebenen Symbole bezeichnen native DNS-Präparate, die in letzter Zeit im Institut für Strahlenbiologie untersucht wurden. Darunter befinden sich auch die in dieser Arbeit untersuchten Proben. Sie stehen mit den von anderen Autoren untersuchten Präparaten in guter Übereinstimmung.

Abb. 1

Diese Beziehung gilt für native DNS in einer Ionenkonzentration von 0,1 - 1,0 M Na^+ , ist also relativ unempfindlich auf Veränderungen des Ionenmilieus. Bei denaturierter DNS ist die Beziehung $S^0/[\eta]$ von der jeweiligen Denaturierungsart abhängig (HAGEN (1967)). Es wurden deshalb die von uns untersuchten denaturierten DNS-Proben zur

Aufstellung der $S^0/[\eta]$ -Beziehung verwendet (Abb. 2).

Abb. 2

Mit dieser Beziehung läßt sich die Extrapolation der S_{app} -Werte zu S_i^0 auch für denaturierte DNS nach Gleichung (5) durchführen. Für die Ermittlung der Sedimentationsverteilung wurden stets mehrere Aufnahmen verschiedener Versuche herangezogen; ein Beispiel dafür bringt die Abb. 3, die die Verteilung als Integralkurve darstellt.

Abb. 3

Die erhaltene Sedimentationsverteilung kann in eine Molekulargewichtsverteilung M_i gegen c_i nach der Gleichung (3) umgewandelt werden. Diese Konstanten werden aus der Beziehung von S^0 zu $[\eta]$ durch Umrechnung auf $M_{s\eta}$ nach der Gleichung (4) gewonnen, wie von EIGNER und DOTY ausführlich beschrieben wurde.

Aus der Molekulargewichtsverteilung M_i zu c_i kann das Gewichts- und Zahlenmittel des Molekulargewichtes bestimmt werden:

$$M_w = \sum_{i=1}^n (c_i - c_{i-1}) \frac{M_i + M_{i-1}}{2} \quad (6)$$

$$M_n = 1 / \sum_{i=1}^n \frac{(c_i - c_{i-1})^2}{(M_i + M_{i-1})} \quad (7)$$

wobei n die Zahl der Meßpunkte der Verteilung ist.

Das ganze Auswerteverfahren lag als Rechenprogramm für eine elektronische Rechenmaschine vor. Für jede DNS-Probe wurden jeweils mindestens zwei Aufnahmen ausgewertet; meist ergab sich eine gute Übereinstimmung der erhaltenen Molekulargewichte. Einzelheiten dieses Verfahrens sind bei COQUERELLE u.a. beschrieben.

Zur Berechnung der in einem Molekül eingetretenen Brüche (B) benötigt man die mittlere Kettenlänge \bar{P} , die nach der Bestrahlung gemessen wird. $\bar{P} = \frac{M_n}{m}$, wobei m das Molekulargewicht des Monomeren ist. In unserem Fall ist ein Monomer der doppelsträngigen DNS ein Nukleotidpaar mit einem durchschnittlichen Gewicht von 617 und für denaturierte DNS ein Nukleotid.

$$B = \frac{M_{n_0}}{M_n} - 1 = \frac{P_0}{\bar{P}} - 1 \quad (8)$$

Die Bruchwahrscheinlichkeit pro Nukleotidpaar (A) ist $\frac{B}{P_0}$. Entsprechend gilt für den Einzelstrang α = Bruchwahrscheinlichkeit pro Monomer bzw. pro Phosphoresterbindung.

Außer den Brüchen können Vernetzungen entstehen, indem ein Radikal im Polymer mit einem zweiten reagiert anstatt mit einem Radikal des Lösungsmittels. Das Verhältnis zwischen Brüchen und Vernetzungen kann nach CHARLESBY (1960) ermittelt werden, sofern M_w und M_n bekannt sind:

$$\frac{1}{M_n} = \frac{1}{M_{n_0}} + (p_0 - \frac{1}{2} q_0) \frac{D}{m} \quad (9)$$

$$\frac{1}{M_w} = \frac{1}{M_{w_0}} + (\frac{1}{2} p_0 - q_0) \frac{D}{m} \quad (10)$$

p_0 = Wahrscheinlichkeit eines Bruches pro Bindung (A)

q_0 = Wahrscheinlichkeit eines Monomers, an einer Vernetzungsreaktion beteiligt zu sein

Wird $\frac{1}{M_w}$ und $\frac{1}{M_n}$ gegen die Dosis aufgetragen, entsprechend den Gleichungen (9) und (10), kann aus den beiden Neigungen der Geraden $(p_0 - \frac{1}{2} q_0) = k_n$ und $(\frac{1}{2} p_0 - q_0) = k_w$ das Verhältnis $\frac{p_0}{q_0} = Q$ errechnet werden:

$$\frac{p_0}{q_0} = \frac{k_w - 2 k_n}{2 k_w - k_n} = Q \quad (11)$$

2.8. Bestimmung des Schmelzpunktes der DNS-Lösungen
(Temperaturabhängigkeit der optischen Dichte)

Die zu untersuchende Lösung wird mit 0,2 M NaCl so weit verdünnt, daß die Extinktion bei 260 nm (1 cm Schichtdicke) etwa 2,0 beträgt. Dann wird die Lösung in einer kontinuierlich heizbaren Quarzküvette im Spektralphotometer (Zeiss) bis auf etwa 95 °C erhitzt, und die Extinktion bei 260 nm bei der jeweiligen Temperatur gemessen. Die Temperatur wird in der Küvette mit einem Thermoelement bestimmt. Die Schmelzpunktkurve erhält man, indem man die Extinktionswerte in % gegen die Temperatur aufträgt. Als Schmelzpunkt wird diejenige Temperatur bezeichnet, bei der 50 % der maximal möglichen Absorptionserhöhung erreicht wird.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung des Nukleoproteins

Nukleoprotein der Fa. Worthington und Nukleoprotein, von uns aus Kalbsthymus isoliert, wurden im Hinblick auf ihre chemische Zusammensetzung miteinander verglichen (Tab. 1). Dabei zeigte sich, daß die Nukleoproteine zu 35 - 40 % aus DNS, zu 45 - 47 % aus Protein und zu etwa 15 % aus Wasser und Salz bestanden. Beim Protein machte der Histonanteil etwa drei Viertel des Gesamtproteingehaltes aus. Der RNS-Gehalt war beim Worthington-Nukleoprotein vernachlässigbar klein, bei unserem betrug er etwa 2 %.

Tab. 1

Da das käufliche Nukleoprotein keine Nachteile gegenüber dem von uns isolierten zeigte, wurde bei unseren Versuchen mit dem Nukleoprotein der Fa- Worthington gearbeitet.

3.2. Einfluß verschiedener Isolierungsmethoden auf die Qualität der DNS

Mit Phenol allein konnte die DNS nicht aus dem Nukleoprotein isoliert werden, im Gegensatz zum Thymusgewebe, wo die Trennung der DNS vom Protein durch Phenol sehr leicht gelingt. Es ist möglich, daß bei der Isolierung des Nukleoproteins die DNS an das saure Protein irreversibel gebunden wird. Mit Hilfe von proteolytischen Enzymen (DOUNCE u.a. (1966)) aber konnte das Protein entfernt werden. Die Wirkung verschiedener Enzyme wurde untersucht. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle 2. Als Kriterien für die beste Isolierungsmethode wurde die Konzentration der DNS-Lösung, die Viskosität der nativen und denaturierten Probe und der Proteingehalt der Lösung genommen. Das geeignetste Enzym schien das Trypsin zu sein, da es im Hinblick auf die interessierenden Kriterien die besten Resultate ergab: Die DNS-Konzentration der Lösung und die gemessenen Viskositätswerte waren hoch und der Proteingehalt der Lösung niedrig.

Gegen die Verwendung von Chymotrypsin sprach der hohe Eiweißgehalt der DNS-Lösung, gegen die Verwendung von Pronase die niedrigen Viskositätswerte. Eine kombinierte Anwendung von Trypsin und Chymotrypsin zeigte keine Vorteile gegenüber Trypsin.

Aus der mit Trypsin behandelten Nukleoproteinlösung wurde die DNS nach der Methode von COLTER u.a. (1962) isoliert. Dabei zeigte sich, daß die Konzentration der DNS-Lösungen, deren Nukleoproteinlösungen vor der Phenolzugabe auf 1 M NaCl gebracht worden waren (B), viel geringer war, als die der Lösungen, bei denen das 1 M NaCl weggelassen worden war (A). Auf Grund dieser Beobachtung haben wir bei unseren Versuchen die Isolierungsart A (Tab. 2) bevorzugt.

Tab. 2

3.3. Veränderungen des Molekulargewichtes nach Bestrahlung

Die erhaltenen Nukleoproteingele wurden mit Dosen von 0,5 bis 6 Mrad bestrahlt. In diesem Bereich sind die Veränderungen des Molekulargewichtes am ehesten meßbar.

3.3.1. Bruchwahrscheinlichkeit

Molekulargewichte, Viskositätswerte und Bruchhäufigkeit im Doppelstrang pro Nukleotidpaar (λ) bzw. Bruchwahrscheinlichkeit im Einzelstrang pro Bindung (α) können aus den Tabellen 3 und 4 entnommen werden. Zur Berechnung von α wurden nur die ersten beiden Kontrollwerte herangezogen, da bei den übrigen Werten eine unvollständige Denaturierung nicht ausgeschlossen werden kann, wobei Aggregationen einzelner Moleküle möglich sind. Zudem liegen diese beiden ersten Werte auf der Regressionsgeraden der $\frac{1}{M}$ - Werte (vergl. Abb. 8) und sind somit wahrscheinlich die richtigen Werte. Man sieht, daß Viskosität, Sedimentationskonstante und Molekulargewicht der nativen und der denaturierten DNS mit zunehmender Bestrahlungsdosis abnehmen. Entsprechend steigt die Anzahl der Brüche pro Nukleotidpaar bzw. Bindung an.

Tab. 3

Tab. 4

Abb. 4 zeigt die Abhängigkeit der Bruchwahrscheinlichkeit von der Dosis bei nativer DNS, Abb. 5 bei denaturierter DNS. Bei nativer DNS steigt die Kurve bis zu der Dosis von 4 Mrad linear an, dann folgt eine quadratische Komponente. Bei denaturierter DNS findet sich im gesamten Dosisbereich nur ein linearer Anteil. Das Verhältnis von Einzel- zu Doppelbrüchen beträgt im linearen Anteil der Kurven 4,46:1.

Abb. 4

Abb. 5

Da die DNS im feuchten Gel bestrahlt wird, muß die direkte sowie die indirekte Strahlenwirkung auf die DNS berücksichtigt werden. Bei der Absorption der Strahlenergie innerhalb der DNS können durch einen primären Ionisationsakt beide Stränge gleichzeitig brechen.

Unabhängig davon entstehen nach Bestrahlung Einzelbrüche. Sie können zu einem Doppelbruch führen, wenn zwei genau gegenüberliegen oder durch höchstens 3 Nukleotidpaare voneinander getrennt sind (HAGEN (1967)). Die Anzahl der Doppelbrüche, die durch benachbarte Einzelbrüche entstehen, errechnet sich aus der Bruchwahrscheinlichkeit α für einen Einzelbruch. Da α linear zur Dosis ansteigt, gibt

$$\alpha = k \cdot D,$$

wobei k die Bruchwahrscheinlichkeit pro Bindung und rad ist. k wird graphisch aus Abb. 4 ermittelt und beträgt $2,66 \times 10^{-10}$. Die Wahrscheinlichkeit, daß zwei gegenüberliegende Einzelbrüche zu einem Doppelbruch führen, ist

$$(k \cdot D)^2.$$

Die Wahrscheinlichkeit, daß benachbarte, durch mehrere Nukleotidpaare (h) getrennte Einzelbrüche zu Doppelbrüchen führen, ist nach THOMAS (1956)

$$A' = (k \cdot D)^2(1 + 2h),$$

wobei nach HAGEN (1967) $(1 + 2h) = 7$ ist.

Wie Tab. 5 zeigt, ergeben sich für A' gegenüber der Gesamtzahl der Doppelbrüche A vernachlässigbar kleine Werte, die erst im höheren Dosisbereich etwas ansteigen. Es ist aber möglich, daß die Abweichung von dem linearen Anstieg der Doppelbrüche über 5 Mrad durch diese zusätzlichen Doppelbrüche bedingt ist.

Tab. 5

3.3.2. Bestimmung von möglichen Vernetzungen

Nach den Angaben von LUZZATI und NICOLAIEFF (1963) sollen in dem beschriebenen Gelzustand des Nukleoproteins von einer Konzentration von 0,53 die Nukleinsäurefäden einzeln vom Histon umhüllt sein. Die Möglichkeit von Vernetzungsreaktionen zwischen zwei DNS-Molekülen war demnach weitgehend auszuschließen. Es erschien uns aber wichtig, genau zu prüfen, ob nicht trotzdem intermolekulare Vernetzungen entstehen, wie sie nach Bestrahlung von trockener DNS, von DNS-Gelen oder von DNS-Lösungen auftreten (LETT u.a. (1961), HAGEN und WELLSTEIN (1965), HAGEN (1967)).

Unser Untersuchungsmaterial erlaubt die Anwendung mehrerer Kriterien für das Auftreten von Vernetzungen. Zunächst können die erhaltenen Sedimentationsverteilungen nach den verschiedenen Bestrahlungsdosen herangezogen werden. Ähnlich wie in Abb. 3 wurden die Verteilungen, die nach verschiedenen Strahlendosen erhalten wurden, gemittelt und in Abb. 6 zusammengefaßt.

Abb. 6

Würden nach Bestrahlung des Nukleoproteingehäuses Vernetzungen auftreten, so müßten zunehmend auch größere, rasch wandernde Moleküle auftreten, wie man das nach Bestrahlung trockener DNS (HAGEN und WELLSTEIN (1965)) deutlich sehen kann oder auch angedeutet bei Bestrahlung von DNS-Lösungen (HAGEN (1967)). Dies ist aber nicht der Fall, vielmehr findet man über den ganzen Dosisbereich einen gleichmäßigen Abfall der Sedimentationskonstanten.

Als weiteres Kriterium für das Vorliegen von möglichen Vernetzungen kann das Verhältnis von M_w zu M_n verwendet werden. Wie von SCHULZ (1942) gezeigt wurde, nähert sich dieses Verhältnis bei einem statistischen Abbau dem Wert 2, auch wenn die Ausgangssubstanz nicht molekular-einheitlich ist, sondern ein polymolekulares Gemisch darstellt. Bestrahlt man wässrige DNS-Lösungen, so

steigt $\frac{M_w}{M_n}$ auf die Werte bis zu 5 an (HAGEN (1967)). Dies bedeutet zunächst, daß die Degradierung der DNS durch ionisierende Strahlung nicht statistisch verteilt eintritt, sondern daß mehr große Moleküle übrigbleiben, als aus dem Zahlenmittel erwartet werden kann. Nach einer Degradierung der DNS mit Desoxyribonuklease findet man dagegen für $\frac{M_w}{M_n}$ niemals Werte über 2 (ULLRICH (1967)), was auf einen statistischen Abbau der Moleküle schließen läßt. Wie die Tabellen 3 und 4 zeigen, bleibt unter unseren Bestrahlungsbedingungen das Verhältnis $\frac{M_w}{M_n}$ ebenfalls unter 2, und zwar sowohl bei der nativen als auch bei der denaturierten DNS.

Exakte Berechnungen über die Zahl der Vernetzungen sind nach dem Verfahren von CHARLESBY (1960) möglich, das im methodischen Teil unter 2.7.3.2. beschrieben wurde. Nach der Gleichung 9 und 10 gibt die Beziehung der reziproken Molekulargewichte zur Dosis die Grundlage der Berechnung. Unsere Meßdaten für die native und denaturierte DNS sind in Abb. 7 und 8 in dieser Weise zusammengestellt. Mit Hilfe der Varianzanalyse (QUENOUILLE (1953)) wurde aus den einzelnen Meßwerten die Neigung der Regressionsgeraden b mit ihrer Fehlergrenze berechnet. Dabei ist b_w die Neigung von $\frac{1}{M_w}$ gegen die Dosis und b_n die von $\frac{1}{M_n}$ gegen die Dosis.

Abb. 7

Abb. 8

Nach Gleichung (11) ist dann

$$\frac{p_0}{q_0} = \frac{b_w - 2b_n}{2b_w - b_n} \quad (12)$$

Für die native DNS erhielten wir:

$$b_w = 0,05386 \pm 0,00597$$

$$b_n = 0,0901 \pm 0,003045$$

Für die denaturierte DNS erhielten wir:

$$b_w = 0,4175 \pm 0,0721$$

$$b_n = 0,6747 \pm 0,0797$$

Nach Gleichung (12) erhalten wir nur dann Vernetzungen, wenn $b_n > 2b_w$. Da $b_w - 2b_n$ stets negativ ist, muß also auch $2b_w - b_n$ negativ sein. Bei nativer sowie denaturierter DNS ist jedoch $b_n < 2b_w$, was darauf hinweist, daß keine Vernetzungen eingetreten sind. Die Werte für b_w und b_n haben einen Fehler von 3,3 bis 17,2 % Standardabweichung. Innerhalb einer gewissen Wahrscheinlichkeit sind deshalb Vernetzungen nicht auszuschließen. So läßt sich die Überschreitungswahrscheinlichkeit für $b_n > 2b_w$ nach dem üblichen Verfahren des Vergleichs zweier Mittelwerte ermitteln.

$$t = \frac{2b_w - b_n}{\sqrt{(2\sigma_{b_w})^2 + \sigma_{b_n}^2}}$$

Für native DNS findet man für $t = 1,427$, was einer Wahrscheinlichkeit p von 0,113 nach der Studentverteilung entspricht. Für denaturierte DNS ist $t = 1,492$ und $p = 0,119$. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 11 - 12 % ist es also überhaupt möglich, daß Vernetzungen eingetreten sind. Ist $2b_w = b_n$, so ist aber $\frac{p_0}{q_0}$ unendlich groß, mögliche Vernetzungen also null. Wir bestimmten daher die Zahl der Vernetzungen, die sich ergeben, wenn man b_n und b_w bis zu der 5 % Grenze der Wahrscheinlichkeit einander nähert, und zwar dann für jedes b_n um $1,645 \cdot \sigma$, was einem einseitigen Vertrauensbereich von $p = 0,05$ entspricht. Dann wird b_n kleiner als b_w . Trotzdem ist unter diesen Bedingungen die Zahl der möglichen Vernetzungen sehr gering.

Wir setzen $b_w^* = b_w - 1,645 \cdot \sigma$ und $b_n^* = b_n + 1,645 \cdot \sigma$

Dann ergibt sich bei nativer DNS

$$\frac{p_0^*}{q_0^*} = 25,7$$

und für denaturierte DNS

$$\frac{p_0^*}{q_0^*} = 6,31$$

Wir können also feststellen, daß nach Bestrahlung der DNS im Nukleoprotein im Mittel nur Brüche, aber keine Vernetzungen entstehen. Aus der Streuung der Meßdaten ist es nur zu 11,5 % wahrscheinlich, daß überhaupt Vernetzungen vorliegen, die aber mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % nicht über $\frac{1}{25}$ der Brüche der nativen DNS und nicht über $\frac{1}{6}$ der Brüche der Einzelkette betragen. Sie können deshalb für weitere Betrachtungen vernachlässigt werden.

3.4. Schmelzpunktbestimmungen

Die Absorptionserhöhung der DNS bei 260 nm während einer Erhitzung auf 90 °C ist durch die Spaltung der Wasserstoffbrücken der beiden Nukleotidstränge bedingt. Nach Bestrahlung erfolgt die Denaturierung schon bei tieferen Temperaturen. Entsprechend wird der Schmelzpunkt der DNS niedriger (Abb. 9).

Abb. 9

Aus unseren Schmelzpunktprofilen ergibt sich eine stetige Erniedrigung des Schmelzpunktes mit steigender Dosis. Wie aus der Legende der Abb. 9 zu entnehmen ist, beträgt die Schmelzpunkterniedrigung etwa 0,5 °C pro 1 Mrad.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit haben wir Nukleoprotein als Gel bei einer Konzentration von $0,53 \pm 0,01$ bestrahlt. Damit erschien uns am ehesten der physikalische Zustand nachgeahmt, in dem die DNS im Interphasechromosom der Säugetierzelle vorliegt. Als Kriterien für die DNS-Veränderung im bestrahlten Nukleoprotein wählten wir das

Auftreten von Brüchen sowohl im Einzel- (α) als auch im Doppelstrang (A) und die Veränderung der Stabilität der Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Nukleotidsträngen. Molekulargewichtsbestimmungen der nativen und denaturierten DNS erlauben die durch Strahlung verursachten Einzel- und Doppelbrüche zu erkennen. Damit sollte untersucht werden, ob die DNS im Nukleoprotein in grundsätzlich anderer Weise durch ionisierende Strahlen geschädigt wird als in wässriger Lösung. Es kann dabei die Frage diskutiert werden, in welcher Weise die zahlreichen Untersuchungen an bestrahlten DNS-Lösungen auf die Verhältnisse in der lebenden Säugetierzelle angewendet werden dürfen.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, das Molekulargewicht der DNS zu bestimmen. Für die native DNS haben wir fünf und für die denaturierte DNS drei verschiedene Bestimmungsmethoden herangezogen, um mehrere Molekulargewichtswerte zu erhalten und sie miteinander vergleichen zu können.

Aus der Beziehung $[\eta] = 6,9 \cdot 10^{-4} \cdot M_{\eta}^{0,70}$ (EIGNER und DOTY (1965)) können wir M_{η} für native DNS berechnen. Für denaturierte DNS lagen hierfür keine zuverlässigen Konstanten vor, so daß wir in diesem Fall auf M_{η} verzichten mußten. M_s ergibt sich aus der Gleichung $S^0 = a_s \cdot M_s^{b_s}$, wobei a_s und b_s für native und denaturierte DNS verschiedene Konstanten sind, welche durch Vergleichsmessungen bestimmt werden können (siehe 2.7.3.1.). Wenn die Viskosität und die Sedimentationskonstante der DNS-Probe bekannt ist, läßt sich nach einer Gleichung von MANDELKERN und FLORY (1952) ein Molekulargewicht $M_{s\eta}$ berechnen, das im Gegensatz zu M_s oder M_{η} keinerlei empirischer Konstanten bedarf, und das unabhängig von der verwendeten Ionenkonzentration gilt. Durch Auswertung des Gradienten in der analytischen Zentrifuge kann weiter die Verteilung der Molekulargewichte eines polymolekularen Gemisches ermittelt werden. Aus dieser Verteilung ergibt sich dann das Gewichtsmittel M_w und das

Zahlenmittel M_n des Molekulargewichtes.

Wie Tab. 3 und 4 zeigen, fanden wir proportional zur Bestrahlungsdosis eine Abnahme des Molekulargewichtes. In Übereinstimmung mit theoretischen Überlegungen (STUART (1953), TANFORD (1966)) ergab sich beim Vergleichen der auf verschiedene Art und Weise ermittelten Molekulargewichtswerte, daß M_s mehr M_w , und M_η mehr M_n entsprach, während $M_{s\eta}$ zwischen dem Gewichts- und Zahlenmittel lag.

Ebenso wie nach der Bestrahlung von trockener DNS (HAGEN und WELLSTEIN (1965)) fanden wir nach Bestrahlung der DNS im Nukleoprotein-Gel, daß die Bruchwahrscheinlichkeit für Doppelbrüche sowie für Einzelbrüche linear mit der Dosis ansteigt. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die Doppelbrüche der DNS im bestrahlten Nukleoprotein-Gel auf ein einzelnes direktes Absorptionseignis zurückzuführen sind. Bei Bestrahlungen wässriger DNS-Lösungen entstehen dagegen die Doppelbrüche vorwiegend durch gegenüberliegende Einzelbrüche, was sich in einem quadratischen Anstieg der Kurve zeigt (HAGEN (1967)). In dem von uns untersuchten Dosisbereich war jedoch dieser Anteil der Doppelbrüche, der durch benachbarte Einzelbrüche entsteht, sehr gering, so daß er vernachlässigt werden konnte.

Bei unseren Versuchen wurden $2,66 \times 10^{-4}$ Einzel- und $0,596 \times 10^{-4}$ Doppelbrüche pro Mrad festgestellt. Nach Bestrahlung der DNS im Nukleoprotein-Gel traten somit Einzelbrüche etwa fünf mal häufiger auf als Doppelbrüche. Dies entspricht etwa den Werten, die von anderen Autoren angegeben worden sind. So findet FREIFELDER (1965) bei Bakteriophagen ein Verhältnis von 10:1 und DEAN (1966) bei Bakterien eines von 5:1.

Nach LUZZATI und NICOLAIEFF (1963) liegen die DNS-Fäden in dem von uns gewählten Gelzustand des Nukleoproteins bei einer Konzentration von etwa 0,53 ge-

trennt voneinander vor. Unsere Ergebnisse erlauben eine Überprüfung dieser Vostellung. Als Kriterien für das Auftreten bzw. Vorliegen von Vernetzungen wurde die Sedimentationsverteilung sowie das Verhältnis von M_w zu M_n herangezogen. Zusätzlich wurden genaue Berechnungen über die Zahl von Vernetzungen nach CHARLESBY (1960) durchgeführt. Bei allen diesen verschiedenen Methoden konnten keine Vernetzungen festgestellt werden, so daß wir daraus folgern konnten, daß bei der Konzentration von 0,53 die DNS-Moleküle tatsächlich getrennt voneinander vorliegen. Demgegenüber findet man nach Bestrahlung wässriger DNS-Lösungen ein Verhältnis von $\frac{p_0}{q_0}$ von 3 bis 4 (HAGEN (1967), BOHNE u.a. (1967)), das heißt, auf 3 bis 4 Brüche kommt eine Vernetzungsreaktion.

Um DNS-Veränderungen, die nach Bestrahlung von Nukleoprotein-Gel auftreten, mit denen, die in der Literatur beschrieben wurden, vergleichen zu können, eignet sich der G-Wert besonders gut. Man versteht darunter die Zahl der durch Strahlung hervorgerufenen Ereignisse pro 100 eV absorbierte Energie. Der G-Wert ist 1, wenn $0,62 \times 10^{12}$ Ereignisse pro rad und cm^3 auftreten. Bei uns beträgt die Konzentration der DNS im Nukleoprotein 248 mg pro g, das entspricht $4,84 \times 10^{20}$ Nukleotidmolekülen pro g, bzw. ebensovielen Bindungen zwischen den Monomeren des Einzelstranges. Für den Einzelstrang wurde eine Bruchwahrscheinlichkeit von $2,66 \times 10^{-10}$ pro rad ermittelt. Die Anzahl der Einzelbrüche pro rad und g ist demnach $4,84 \times 10^{20} \times 2,66 \times 10^{-10} = 0,1286 \times 10^{12}$. Daraus ergibt sich ein G-Wert von 0,208, das heißt pro 100 eV absorbierte Energie finden 0,208 Einzelbrüche statt oder 480 eV sind erforderlich, um einen Einzelbruch zu erzeugen. Für die Doppelbrüche ergibt sich ein G-Wert von 0,0466 bzw. 2150 eV Energieaufwand.

Zum Vergleich seien in der Tabelle 6 einige G-Werte zusammengestellt, die in der Literatur für Einzel- oder Doppelbrüche unter den verschiedensten Bestrahlungsbe-

dingungen angegeben sind. Für Bestrahlungen in vitro ergeben sich für Einzelbrüche Werte von 70 - 370 eV und für Doppelbrüche 600 - 1250 eV.

Tab. 6

Für die Bruchereignisse nach Bestrahlung in vivo liegen nur wenig zuverlässige Werte vor. Neben dem recht geringen Wert von LETT u.a. (1967) für den Einzelbruch in Leukämiezellen lassen sich auch die Untersuchungen von HOTZ und ZIMMER (1963) heranziehen, bei denen T1-Phagen in vierfacher Nährbouillon durch etwa 500 eV inaktiviert werden. Unter diesen Bedingungen kommt nur die in den Phagen selbst absorbierte Strahlenenergie zur Wirkung. Nach Untersuchungen von BOHNE u.a. (1967) werden unter den gleichen Versuchsbedingungen 0,4 Doppelbrüche pro inaktiviertem Phagen gemessen. Zur Erzeugung eines Doppelbruches sind demnach 1250 eV in den Phagen notwendig.

Die Untersuchungen von HOTZ und ZIMMER (1963) zeigen aber auch, daß der Energiebetrag pro inaktiviertem Phagen nach den jeweiligen Bestrahlungsbedingungen sehr unterschiedlich sein kann. So erhöht er sich auf das 10-fache, auf 5000 eV, wenn man die Phagen im Hochvakuum, also trocken und bei 80 °K bestrahlt. Es ist anzunehmen, daß dabei die im Phagen entstehenden diffusiblen Radikale des Wassers fortfallen und auch die in der DNS entstandenen Makroradikale zunächst nicht weiterreagieren können. Einzelheiten dieser Überlegungen sollen hier nicht weiter behandelt werden, jedoch machen sie deutlich, daß der G-Wert für die Entstehung von Brüchen in der DNS eines bestrahlten Nukleoproteingehäuses erheblich von dem jeweiligen Feuchtigkeitsgehalt abhängen kann. Zusätzlich ist auch bei direkter Einwirkung die Ableitung der Energie auf den umgebenden Histonmantel möglich.

Das Verhältnis von einem Doppelbruch zu 4,5 Einzelbrüchen steht mit den Vorstellungen nicht im Widerspruch, die man über die Natur der Energieabsorption ionisierender Strahlung hat. Nach neuerer Auswertung zahlreicher Nebelkammeraufnahmen von ORE und LARSEN (1964) werden im Mittel pro Primärionisation etwa 54 eV absorbiert. Bei den einzelnen Absorptionsereignissen entsteht aber eine verschiedene Anzahl von Ionenpaaren mit entsprechend auch einem verschiedenen hohen Energieaufwand. So findet man mit einer Häufigkeit von

| | |
|--------|--|
| 63,3 % | nur ein Ionenpaar pro Primärionisation |
| 20,4 % | zwei Ionenpaare pro Primärionisation |
| 9,2 % | drei Ionenpaare pro Primärionisation |

Die übrigen 7,1 % haben mehr als drei Ionenpaare, wobei pro Ionenpaar 33 eV abgegeben werden.

Das bedeutet zunächst, daß etwa zwei Drittel aller Primärionisationen überhaupt nur aus einer Ionisation bestehen. Diese kann entsprechend auch nur in einem Nukleotidstrang lokalisiert sein und nur zu einem Einzelbruch führen. Bei zwei oder mehr Ionenpaaren pro Primärionisation innerhalb des DNS-Moleküls können die Ionisationen entweder nur in einem Strang lokalisiert sein oder in beiden Ketten auftreten. Entsprechend werden entweder Einzelbrüche oder aber auch Doppelbrüche beobachtet. Es sei dazu bemerkt, daß nicht jede Ionisation zum Bruch führen muß, jedoch haben wir vorerst keinen Anhalt dafür, daß die Häufigkeit der Ionenpaare bei den bruchwirksamen Absorptionsereignissen anders verteilt ist als bei den unwirksamen. Weitere Aussagen hierzu können zunächst nicht gemacht werden; aussichtsreich sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen über die Bruchhäufigkeit in Nukleoproteingelen mit verschiedenem Feuchtigkeitsgehalt.

Unsere Untersuchungen über die Abnahme des Schmelzpunktes der DNS nach Bestrahlung erlauben einige Überlegungen über die Ursache dieses Strahleneffektes. Von

HAGEN und WILD (1964) wurde diskutiert, ob nicht die strahlenbedingten Einzelbrüche in der Nukleotidkette die Verschiebung des Schmelzpunktes bedingen.

Da beim Vorliegen von Einzelbrüchen die Stabilität des Moleküls in der Längsrichtung geringer ist, ist es vorstellbar, daß die geschädigten Ketten sich leichter voneinander trennen lassen. Zusätzlich bestehen für die Entspiralisierung der Helix mehr Ausgangspunkte. Diese Annahmen können gestützt werden, wenn man die Verschiebung des Schmelzpunktes mit der Zahl der Einzelbrüche vergleicht und nachsieht, ob diese Beziehung auch unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen gilt, wenn ganz unterschiedliche Werte für Einzelbrüche und Schmelzpunkt gemessen werden.

Aus Abb. 9 und den in der Legende mitgeteilten Werten für den Schmelzpunkt ist zu entnehmen, daß pro Megarad T_m um $0,5^\circ\text{C}$ abnimmt. Die Bruchwahrscheinlichkeit des Einzelstranges ist $2,66 \times 10^{-4}$ pro Megarad. Nach einer Strahlendosis, die zu einem ΔT_m von $1,0^\circ\text{C}$ führt, werden also $5,32 \times 10^{-4}$ Einzelbrüche pro Bindung gezählt. Einen ähnlichen Wert erhält man, wenn man die entsprechenden Daten ansieht, die nach Bestrahlung wässriger DNS-Lösungen erhalten werden. Bei Bestrahlung von $500 \mu\text{g}$ DNS pro ml in $0,2 \text{ M NaCl}$ findet man nach ULLRICH (1967) eine Verschiebung des Schmelzpunktes von $0,3^\circ\text{C}$ pro Kilorad. Nach HAGEN (1967) werden unter diesen Bedingungen $1,70 \times 10^{-4}$ Einzelbrüche pro Kilorad und Bindung gefunden. Nach einer Strahlendosis mit einem ΔT_m von $1,0^\circ\text{C}$ werden entsprechend $5,67 \times 10^{-4}$ Einzelbrüche pro Bindung gemessen.

Die Versuche von HAGEN und WELLSTEIN (1965) an trocken bestrahlter DNS können nur bedingt zu einem solchen Vergleich herangezogen werden, da dort der Schmelzpunkt der DNS in $0,01 \text{ M NaCl}$ gemessen wurde, nicht in $0,2 \text{ M NaCl}$ wie bei den oben zitierten Versuchen. Die strahlenbedingte Schmelzpunktverschiebung ist nämlich in

0,01 M NaCl größer. Wir finden dort etwa ein ΔT_m von $1,25^\circ\text{C}$ pro Megarad und $2,51 \times 10^{-4}$ Einzelbrüche pro Megarad und Bindung. Entsprechend ergeben sich dann $2,0 \times 10^{-4}$ Einzelbrüche pro Dosis, die zu einem ΔT_m von $1,0^\circ\text{C}$ führt.

Diese recht ähnlichen Werte für das Verhältnis von Einzelbrüchen zu der strahlenbedingten Verschiebung des Schmelzpunktes unter ganz verschiedenen Bestrahlungsbedingungen machen es zumindest nicht unwahrscheinlich, daß die Einzelbrüche in der DNS-Helix zu dieser verminderten Stabilität der Wasserstoffbrücken führen.

5. Zusammenfassung

Es wird Desoxyribonukleoprotein als feuchtes Gel mit einer Konzentration von 0,53 mit ^{60}Co - γ -Strahlen bestrahlt (0,5 - 6,0 Mrad), die DNS vom Protein getrennt und anschließend geprüft, inwieweit die DNS durch die Strahlung geschädigt wurde. Als Kriterien für die DNS-Veränderung dienen die Bruchentstehung im Einzel- und Doppelstrang, das Auftreten von Vernetzungen und die Verschiebung des Schmelzpunktes.

Einzelbrüche wie Doppelbrüche steigen linear mit der Dosis an. Dabei sind Einzelbrüche etwa fünf mal häufiger als Doppelbrüche. Es ist wahrscheinlich, daß beide Ereignisse auf die direkte Absorption der Strahlenenergie in der DNS zurückzuführen sind, weniger durch diffusible Radikale aus dem Histonmantel. Der Energiebetrag, der für die Entstehung eines Einzel- bzw. Doppelbruches erforderlich ist, beläuft sich auf 480 bzw. 2150 eV.

Vernetzungen konnten nach Bestrahlung der DNS im Nukleoprotein-Gel nicht festgestellt werden. Die Vorstellungen von LUZZATI und NICOLAIEFF (1963), daß bei einem Feuchtigkeitsgehalt von etwa 45 % die DNS-Moleküle im Nukleoprotein-Gel isoliert voneinander und vom Histonmantel umgeben vorliegen, konnte dadurch bestätigt werden. Die Ursachen der strahlenbedingten Verschiebung des Schmelzpunktes der DNS werden diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

BERNSTEIN, M.H. (1954)

Deoxyribonucleoproteins of Cell Nuclei: Sensitivity to X-Rays.

Nature 174, 463

BOHNE, L., TH. COQUERELLE, U. HAGEN (1967)

Degradation of the DNA Molecule in irradiated T1-Phages. Fifth Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology. Spindlerův Mlýn - Bedřichov (Tschechoslowakei)

BURTON, K. (1956)

A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid.

Biochem. J. 62, 315

BUTLER, J.A.V. (1959)

Changes Induced in Nucleic Acids by Ionizing Radiations and Chemicals.

Radiation Research, Suppl. 1, 403

CHARLESBY, A. (1960)

Atomic Radiation and Polymers.

Pergamon Press, Oxford.

CHEN, P.S., T.Y. TORIBARA, and H. WARNER (1956)

Mikrodetermination of Phosphorus.

Analyt. Chem. 28, 1756

COLLYNS, B., S. OKADA, G. SCHOLES, J.J. WEISS, and

C.M. WHEELER (1965)

Chain Scission and Hydrogen Bond Breakage on Irradiation of DNA.

Radiation Research 25, 526

- COLTER, J.S., R.A. BROWN, and K.A.O. ELLEM (1962)
Observations on the Use of Phenol for the Isolation of
Deoxyribonucleic Acid.
Biochim. Biophys. Acta 55, 31
- COQUERELLE, TH., L. BOHNE, U. HAGEN und H. MERKWITZ (1967)
Strahlenempfindlichkeit von Bakteriophagen-DNS.
Manuskript in Vorbereitung.
- DEAN, C.J., P. FELDSCHREIBER, and J.T. LETT (1966)
Repair of X-ray damage to the Deoxyribonucleic acid in
Micrococcus radiodurans.
Nature 209, 49
- DISCHE, Z. (1930)
Neue charakteristische Farbreaktion der Thymonuklein-
säure und Mikromethoden zur Bestimmung derselben in
tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktion.
Mikrochemie 8, 4
- DOTY, P., B.B. MCGILL, and S.A. RICE (1958)
The Properties of Sonic Fragments of Desoxyribose Nucleic
Acid.
Proc. Nat. Acad. of Science 44, 432
- DOUNCE, A.L., B.B. LOVE, J. DE SIMONE, and M.S. MACKAY (1966)
The visco-elastic properties of DNA-nucleoprotein gels.
Proc. Internat. Symp. on The Cell Nucleus-Metabolism and
Radiosensitivity, Taylor & Francis LTD, pp. 147
- EIGNER, J., and P. DOTY (1965)
The Native Denatured and Renatured States of Deoxyribo-
nucleic Acid.
J. Mol. Biol. 12, 549
- EIGNER, J., C. SCHILDKRAUT, and P. DOTY (1962)
Concentration effects in the hydrodynamic properties
of DNS.
Biochim. Biophys. Acta 55, 13

EMMERSON, P., G. SCHOLES, D.H. THOMSON, J.F. WARD,
and J. WEISS (1960)

Chemical Effects of Ionizing Radiations on Nucleic
Acids and Nucleoproteins.

Nature 187, 319

FREIFELDER, D. (1965)

Mechanism of Inactivation of Coliphage T7 by X-rays.

Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 128

HAGEN, U. (1967)

Bestimmung von Einzel- und Doppelbrüchen in bestrahlter
DNS durch die Molekulargewichtsverteilung.

Biochim. Biophys. Acta 134, 45

HAGEN, U. und R. WILD (1964)

Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der
Desoxyribonucleinsäure. I. Die Empfindlichkeit der
Wasserstoffbrücken.

Strahlenther. 124, 275

HAGEN, U. und H. WELLSTEIN (1965)

Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der DNS.
III. Brüche und Vernetzungen nach direkter Bestrahlung.

Strahlenther. 128, 565

HATSCHEK, E. (1913)

Die allgemeine Theorie der Viskosität zweiphasiger
Systeme.

Kolloid Z. 12, 238

HOTZ, G., and K.G. ZIMMER (1963)

Experiments in radiation chemistry of T1-phage.

Int. J. Rad. Biol. 7, 75

HUTCHINSON, F., and J.ARENA (1960)

Destruction of the Activity of Deoxyribonucleic Acid
in Irradiated Cells.

Radiation Research 13, 137

KAPLAN, H.S. (1967)

DNA strand scission and loss of viability after X-irradiation of bacterial cells.

In: G. Silini, Radiation Research, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam, p. 369

LETT, J.T., and P. ALEXANDER (1961)

Crosslinking and Degradation of Deoxyribonucleic Acid Gels with Varying Water Contents When Irradiated with Electrons.

Radiation Research 15, 159

LETT, J.T., I. CALDWELL, C.J. DEAN, and P. ALEXANDER (1967)

Rejoining of X-ray induced breaks in the DNS of Leukaemia cells.

Nature 214, 790

LETT, J.T., K.A. STACEY, and P. ALEXANDER (1961)

Crosslinking of Dry Deoxyribonucleic Acids by Electrons.

Radiation Research 14, 349

LLOYD, P.H., and A.R. PEACOCKE (1963)

Degradation by Gamma-Irradiation of Thymus Deoxyribonucleohistone in Solution.

Nature 200, 428

LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR, and R.J. RANDALL

R.J. RANDALL (1951)

Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265

LUZZATI, V., and A. NICOLAIEFF (1963)

The Structure of Nucleohistones and Nucleoprotamines.

J. Mol. Biol. 7, 142

MANDELKERN, L., W.R. KRIGBAUM, H.A. SCHERAGA, and

P.J. FLORY (1952)

Sedimentation Behavior of Flexible Chain Molecules

Polyisobutylene.

J. Chem. Phys. 20, 1392

OLINS, D.E., A.L. OLINS, and P.H. von HIPPEL (1967)
Model Nucleoprotein Complexes: Studies on the Interaction
of Cationic Homopolypeptides with DNA.
J. Mol. Biol. 24, 157

ORE, A., and A. LARSEN (1964)
Relative Frequencies of Ion Clusters Containing Various
Numbers of Ion Pairs.
Radiation Research 21, 331

PEACOCKE, A.R., and B.N. PRESTON (1960)
The action of X-rays on sodium deoxyribonucleate in
solution. II. Degradation.
Proc. Roy. Soc. B 153, 90

PEACOCKE, A.R., and B.N. PRESTON (1961)
Effect of Gamma-Rays on Thymus Nucleoprotein in Solution.
Nature 192, 228

QUENOUILLE, M.H. (1953)
Introductory Statistics.
Pergamon Press L.T.D., London.

SCHULZ, G.V. (1942)
Über die Molekulargewichtsverteilungen, die beim Abbau
von Stoffen mit Kettenmolekülen auftreten.
Zeitschr. phys. Chemie B 51, 127

SCHUMAKER, V.N., and H.K. SCHACHMAN (1957)
Ultracentrifugal Analysis of Dilute Solutions.
Biochim. Biophys. Acta 23, 628

STUART, H.A. (1953)
Die Physik der Hochpolymeren. 2. Band: Das Makromolekül
in Lösungen. Achtes Kapitel : Sedimentation und Diffusion
von Makromolekülen.
Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg.

STUY, J.H. (1961)

Radiation Inactivation of Intracellular Transforming
Deoxyribonucleic Acid.

Proefschrift, Utrecht

TANFORD, CH. (1966)

Physical Chemistry of Macromolecules.

John Wiley & Sons, Inc., New York - London - Sydney

THOMAS, C.A. Jr. (1956)

The Enzymatic Degradation of Desoxyribose Nucleic Acid.

J. Am. Chem. Soc. 78, 1861

TSCHAHITSCHI, A. (1966)

Veränderung der Nukleoproteinstruktur nach Röntgen-
bestrahlung.

Inaugural-Dissertation, Freiburg

ULLRICH, M. (1967)

Über die Strahlenempfindlichkeit der Wasserstoffbrücken
in der Desoxyribonukleinsäure.

Dissertation, Universität Karlsruhe.

VOKIN, E., and E.E. COHN (1954)

Estimation of nucleic acids.

Methods of Biochem. Analysis Vol. I, 287,

Academic Press, New York.

WEISS, J.J. (1964)

Chemical Effects of Ionizing Radiation on Nucleic
Acids and Related Compounds.

Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology
3, 103, Academic Press, New York and London.

WILKINS, M.H.F., G. ZUBAY, and H.R. WILSON (1959)

X-ray Diffraction Studies of the Molekular Structure of
Nucleohistone and Chromosomes.

J. Mol. Biol. 1, 179

ZAMENHOF, S. (1957)

Preparation and Assay of Deoxyribonucleic Acid from
Animal Tissue.

Methods in Enzymology Vol. III, 696, ed. S.P. Colowick,
N.O. Kaplan, Academic Press, New York.

ZUBAY, G., and M.H.F. WILKINS (1962)

An X-ray Diffraction Study of Histone and Protamine
in Isolation and in Combination with DNA.

J. Mol. Biol. 4, 444

Tabelle 1: Charakterisierung des mit Aceton und Äther getrockneten Nukleoproteins.

| | umgefällt aus Nukleoprotein von Worthington | isoliert aus Kalbsthymus |
|----------------|---|-----------------------------|
| DNS | 39,20 % | 35,40 % |
| Histon | 32,80 % | 35,00 % |
| saures Protein | 12,10 % | 12,08 % |
| RNS | 0,06 % | 2,14 % |
| Wasser, Salz | 15,84 % | 15,38 % |

Tabelle 2: Einfluß verschiedener Isolierungsmethoden auf die Qualität der DNS.

A: Isolierung nach 2.5

B: vor der Phenolbehandlung auf 1 m NaCl gebracht

| verwendetes Enzym | Isolierungsart | Konzentration der isolierten DNS-Lösung | % Protein | Viskosität [η] nativ | Viskosität [η] denaturiert |
|--------------------------|----------------|---|-----------|----------------------|----------------------------|
| Trypsin | A | 795 | 8,8 | 4350 | 1150 |
| | A | 685 | 35,0 | 5000 | 900 |
| | A | 736 | 11,5 | 5350 | 1025 |
| | A | 712 | 4,2 | 6650 | 1300 |
| | A | 705 | 6,8 | 6000 | 1250 |
| | B | 485 | 43,3 | 7200 | 1000 |
| | B | 344 | 4,8 | 5350 | 550 |
| | B | 467 | 2,1 | 5000 | 750 |
| | B | 420 | 7,0 | 4900 | 700 |
| | Chymotrypsin | A | 725 | 94,0 | 4500 |
| A | | 755 | 31,8 | 5350 | - |
| B | | 478 | 44,7 | 8250 | 1000 |
| Trypsin und Chymotrypsin | A | 693 | - | 5500 | 720 |
| | A | 726 | 4,1 | 5750 | - |
| | A | 740 | 17,6 | 4900 | 1250 |
| | B | 405 | 7,4 | 5600 | 700 |
| | B | 425 | 8,2 | 5000 | 900 |
| Pronase | A | 860 | 16,3 | 1850 | 250 |
| | A | 782 | 117,5 | 3500 | 250 |

Tabelle 3: Molekulargewichte von nativer DNS nach Bestrahlung im Nukleoprotein.

| Dosis) (M-rad) | S_{appw} | $[\eta]$ | $M_s \cdot 10^{-6}$ | $M_\eta \cdot 10^{-6}$ | $M_{s\eta} \cdot 10^{-6}$ | $M_w \cdot 10^{-6}$ | $M_n \cdot 10^{-6}$ | $\frac{M_w}{M_n}$ | $\frac{M_{no}}{M_n} - 1$ | $A \cdot 10^4$ |
|--------------------|------------|----------|---------------------|------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|--------------------------|----------------|
| Kontrolle | 19,95 | 5000 | 8,2 | 9,7 | 7,81 | 10,96 | 5,32 | 2,060 | | |
| | 20,09 | 6650 | 8,4 | 14,6 | 9,10 | 11,29 | 6,47 | 1,745 | | |
| | 19,65 | 6000 | 8,0 | 12,6 | 8,37 | 10,66 | 6,02 | 1,770 | | |
| 0,5 | 18,50 | 3800 | 6,6 | 6,6 | 6,18 | 8,04 | 4,85 | 1,658 | 0,202 | 0,2160 |
| | 18,30 | 3650 | 6,4 | 6,3 | 5,86 | 7,60 | 5,19 | 1,465 | 0,130 | 0,1397 |
| 1,0 | 18,15 | 2925 | 6,2 | 4,5 | 5,20 | 5,63 | 3,86 | 1,457 | 0,509 | 0,5391 |
| | 17,35 | 2450 | 5,4 | 3,5 | 4,44 | 5,83 | 3,78 | 1,543 | 0,547 | 0,5800 |
| 1,5 | 16,42 | 1925 | 4,7 | 2,55 | 3,64 | 5,25 | 3,03 | 1,732 | 0,926 | 0,985 |
| | 17,62 | 2800 | 5,7 | 4,2 | 4,86 | 5,34 | 3,16 | 1,691 | 0,873 | 0,925 |
| 2,0 | 14,75 | 1925 | 3,42 | 2,55 | 3,09 | 6,87 | 3,22 | 2,173 | 0,813 | 0,862 |
| | 15,20 | 2225 | 3,75 | 3,15 | 3,49 | 3,54 | 2,45 | 1,450 | 1,385 | 1,467 |
| 4,0 | 12,10 | 1100 | 1,95 | 1,35 | 1,739 | 3,18 | 1,87 | 1,700 | 2,018 | 2,138 |
| | 13,17 | 1025 | 2,4 | 1,26 | 1,900 | 3,41 | 1,93 | 1,766 | 2,020 | 2,140 |
| 5,0 | 11,10 | 850 | 1,45 | 1,06 | 1,34 | 2,00 | 1,29 | 1,548 | 3,583 | 3,795 |
| | 10,92 | 812 | 1,38 | 1,01 | 1,28 | 1,66 | 1,14 | 1,454 | 4,115 | 4,360 |
| 6,0 | 10,66 | 725 | 1,28 | 0,92 | 1,16 | 1,54 | 1,02 | 1,515 | 4,737 | 5,015 |
| | 11,19 | 650 | 1,47 | 0,83 | 1,19 | 1,84 | 1,26 | 1,584 | 3,610 | 3,823 |

Tabelle 4: Molekulargewichte von denaturierter DNS nach Bestrahlung im Nukleoprotein.

| Dosis (M-rad) | S_{appw} | $[\eta]$ | $M_{s\eta} \cdot 10^{-6}$ | $M_w \cdot 10^{-6}$ | $M_n \cdot 10^{-6}$ | $\frac{M_w}{M_n}$ | $\frac{M_{no}}{M_n} - 1$ | $\alpha \cdot 10^4$ |
|------------------|------------|----------|---------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|--------------------------|---------------------|
| Kontrolle | 15,10 | - | - | 3,188 | 1,358 | 2,345 | | |
| | 13,65 | - | - | 3,132 | 1,401 | 2,235 | | |
| | 16,12 | 900 | 2,73 | 4,598 | 2,867 | 1,791 | | |
| | 15,10 | 1025 | 2,64 | 4,122 | 2,353 | 1,752 | | |
| | 15,50 | 1300 | 3,08 | 4,165 | 2,756 | 1,670 | | |
| | 16,60 | 1250 | 3,36 | 4,606 | 2,981 | 1,544 | | |
| 0,5 | 11,32 | 480 | 1,18 | 1,921 | 1,141 | 1,682 | 0,195 | 0,443 |
| | 10,50 | 500 | 1,07 | 1,321 | 0,659 | 2,005 | 1,067 | 0,242 |
| | 10,98 | - | - | 1,634 | 0,936 | 1,744 | 0,456 | 1,037 |
| 1,0 | 8,60 | 300 | 0,612 | 0,928 | 0,523 | 1,772 | 1,590 | 3,56 |
| | 9,17 | 260 | 0,628 | 1,075 | 0,644 | 1,670 | 1,110 | 2,52 |
| | 8,95 | - | - | 0,896 | 0,590 | 1,507 | 1,300 | 2,95 |
| 1,5 | 7,72 | 225 | 0,451 | 0,893 | 0,532 | 1,679 | 1,550 | 3,53 |
| | 8,24 | 250 | 0,525 | 0,824 | 0,523 | 1,559 | 1,595 | 3,62 |
| 2,0 | 7,20 | 100 | 0,271 | 0,815 | 0,444 | 1,508 | 2,105 | 4,78 |
| | 7,15 | 220 | 0,399 | 0,825 | 0,528 | 1,562 | 1,570 | 3,58 |
| 4,0 | 5,82 | <100 | <0,197 | 0,478 | 0,260 | 1,838 | 4,320 | 9,83 |
| | 6,49 | <100 | <0,232 | 0,559 | 0,341 | 1,640 | 2,980 | 6,77 |
| 5,0 | 5,90 | <100 | <0,204 | 0,316 | 0,145 | 2,179 | 8,570 | 19,50 |
| | 4,98 | <100 | <0,156 | 0,520 | 0,316 | 1,646 | 3,400 | 7,73 |
| 6,0 | 5,34 | <100 | <0,173 | 0,332 | 0,149 | 2,220 | 8,300 | 18,85 |
| | 4,32 | <100 | <0,126 | 0,411 | 0,199 | 2,068 | 5,900 | 13,40 |

Tabelle 5: Anteil der durch benachbarte Einzelbrüche erzeugten Doppelbrüche (A') zu der Gesamtzahl der beobachteten Doppelbrüche (A)

| Dosis (Mrad) | $A' = (k \cdot D)^2 \cdot 7$ | A |
|--------------|------------------------------|-----------------------|
| 1,0 | $0,0049 \cdot 10^{-4}$ | $0,575 \cdot 10^{-4}$ |
| 2,0 | $0,0198 \cdot 10^{-4}$ | $1,200 \cdot 10^{-4}$ |
| 3,0 | $0,0445 \cdot 10^{-4}$ | $1,787 \cdot 10^{-4}$ |
| 4,0 | $0,0792 \cdot 10^{-4}$ | $2,400 \cdot 10^{-4}$ |
| 5,0 | $0,1238 \cdot 10^{-4}$ | $3,187 \cdot 10^{-4}$ |
| 6,0 | $0,1785 \cdot 10^{-4}$ | $4,412 \cdot 10^{-4}$ |

Tabelle 6: G-Werte für den Bruch des Einzelstranges und der Doppelhelix nach Bestrahlung von DNS.

| Bestrahlungsart | Bruchereignis | G-Wert | Energiebedarf pro Bruch (eV) | Autor |
|-----------------------------------|---------------|--------|------------------------------|--|
| 0,43 % DNS-Lösung | Einzelbruch | 1,5 | 70 | Peacocke (1960) |
| 0,1 % " | " | 0,4 | 250 | Collins u.a. (1965) |
| 0,5 % " | " | 0,8 | 125 | " " |
| 0,02 % " | " | 0,27 | 370 | Hagen (1967) |
| trockene DNS im Vakuum | " | 0,63 | 160 | Hagen, Wellstein (1965) |
| DNS im Nukleoprotein-Gel | " | 0,208 | 480 | unsere Ergebnisse |
| Bestrahlung von Leukämiezellen | " | 0,66 | 150 | Lett, Caldwell, Dean, (1967) Alexander (1967) |
| Bestrahlung von M. radiodurans | " | 0,715 | 140 | Dean, Feldschreiber, Lett (1966) |
| trockene DNS | Doppelbruch | 0,125 | 800 | Lett, Stacey, Alexander (1961) |
| DNS-Gel | " | 0,16 | 600 | Lett, Alexander (1961) |
| trockene DNS im Vakuum | " | 0,11 | 909 | Hagen, Wellstein (1965) |
| DNS im NP-Gel | " | 0,0466 | 2150 | unsere Ergebnisse |
| Bestrahlung von T1-Phagen | " | 0,080 | 1250 | Hotz, Zimmer (1963), Bohne u.a. (1967) |

Abb. 1: Beziehung zwischen S° und $[\eta]$ bei nativer DNS
 — Mittelwertkurve von EIGNER und DOTY (1965)
 Symbole untersucht im Institut für Strahlen-
 biologie:

| | | |
|---|----------------|---|
| x | T4-DNS | unbestrahlt |
| ● | T1-DNS | " |
| o | T1-DNS | γ-bestrahlt |
| ▲ | Kalbthymus-DNS | unbestrahlt |
| Δ | " | " abgebaut durch DNSase oder Ultraschall |
| ▲ | " | " γ-bestrahlt |
| ⊠ | " | " isoliert aus Nukleoprotein |
| ○ | " | " isoliert aus bestrahltem Nukleoprotein |

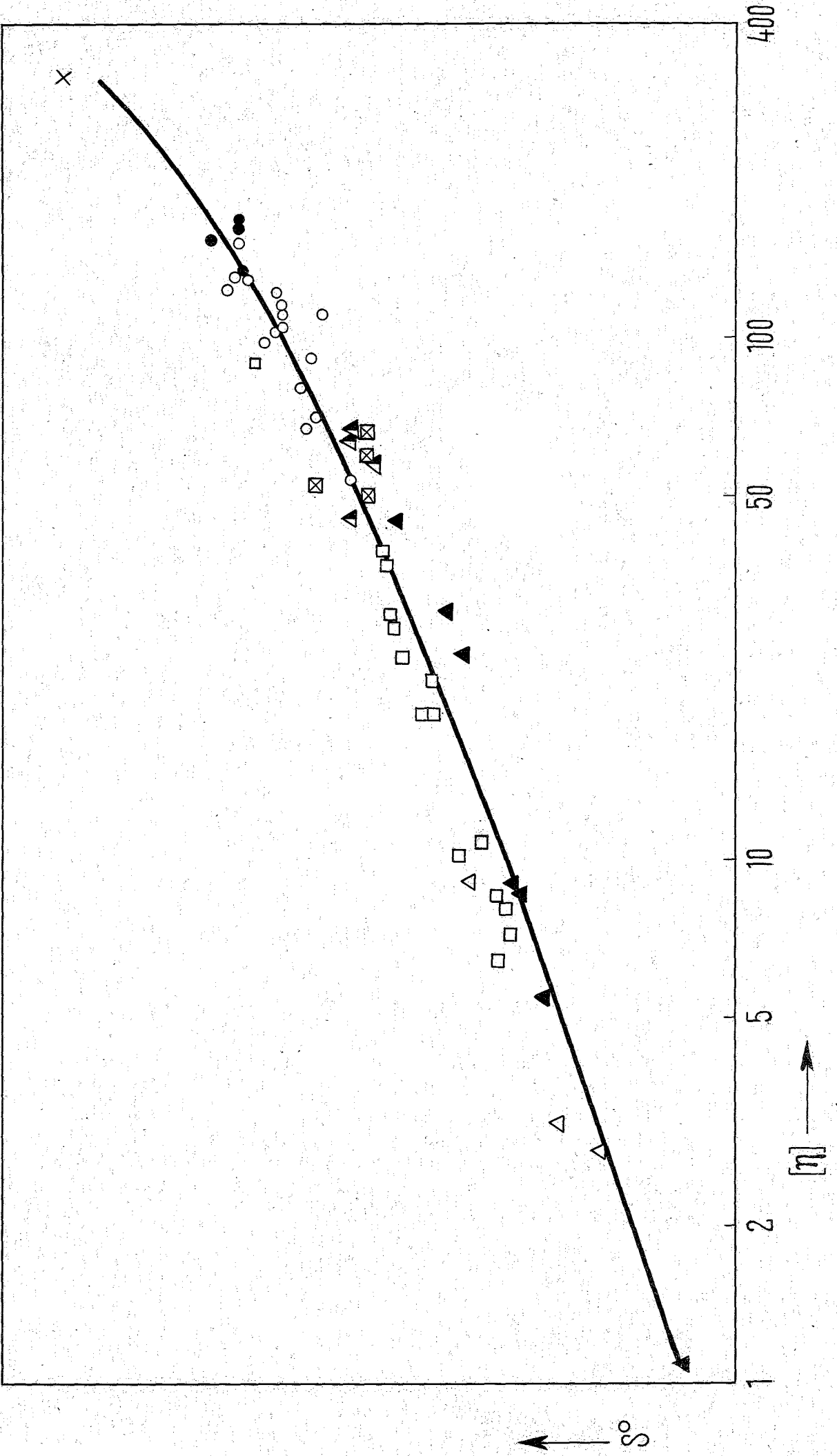


Abb. 2: Beziehung zwischen S° und $[\eta]$ bei denaturierter DNS aus bestrahlten und unbestrahlten Nukleoproteinen.

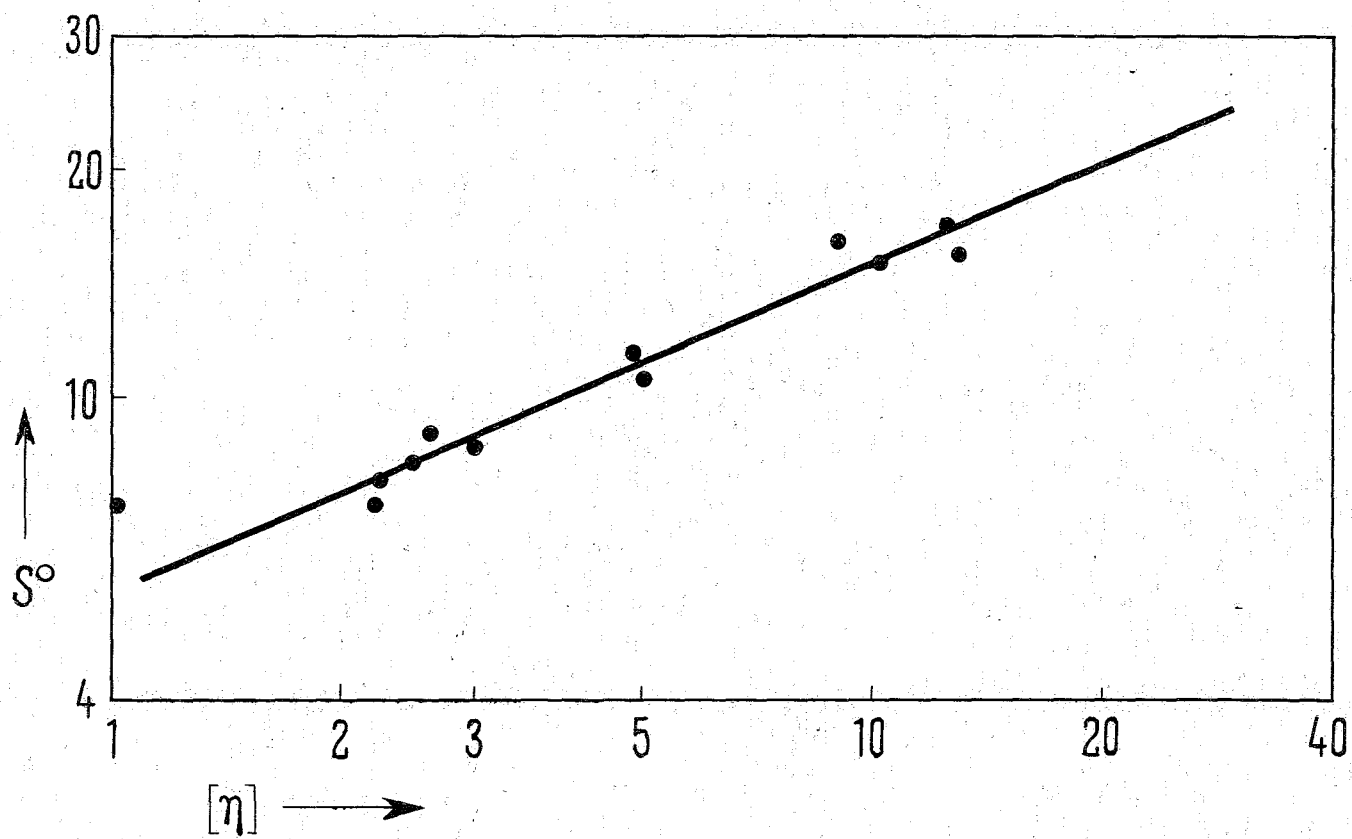


Abb. 3: Integrale Sedimentationsverteilung von DNS-
Präparationen aus unbestrahltem Nukleoprotein.

- o• Experiment I
- ▣ Experiment II
- △△ Experiment III

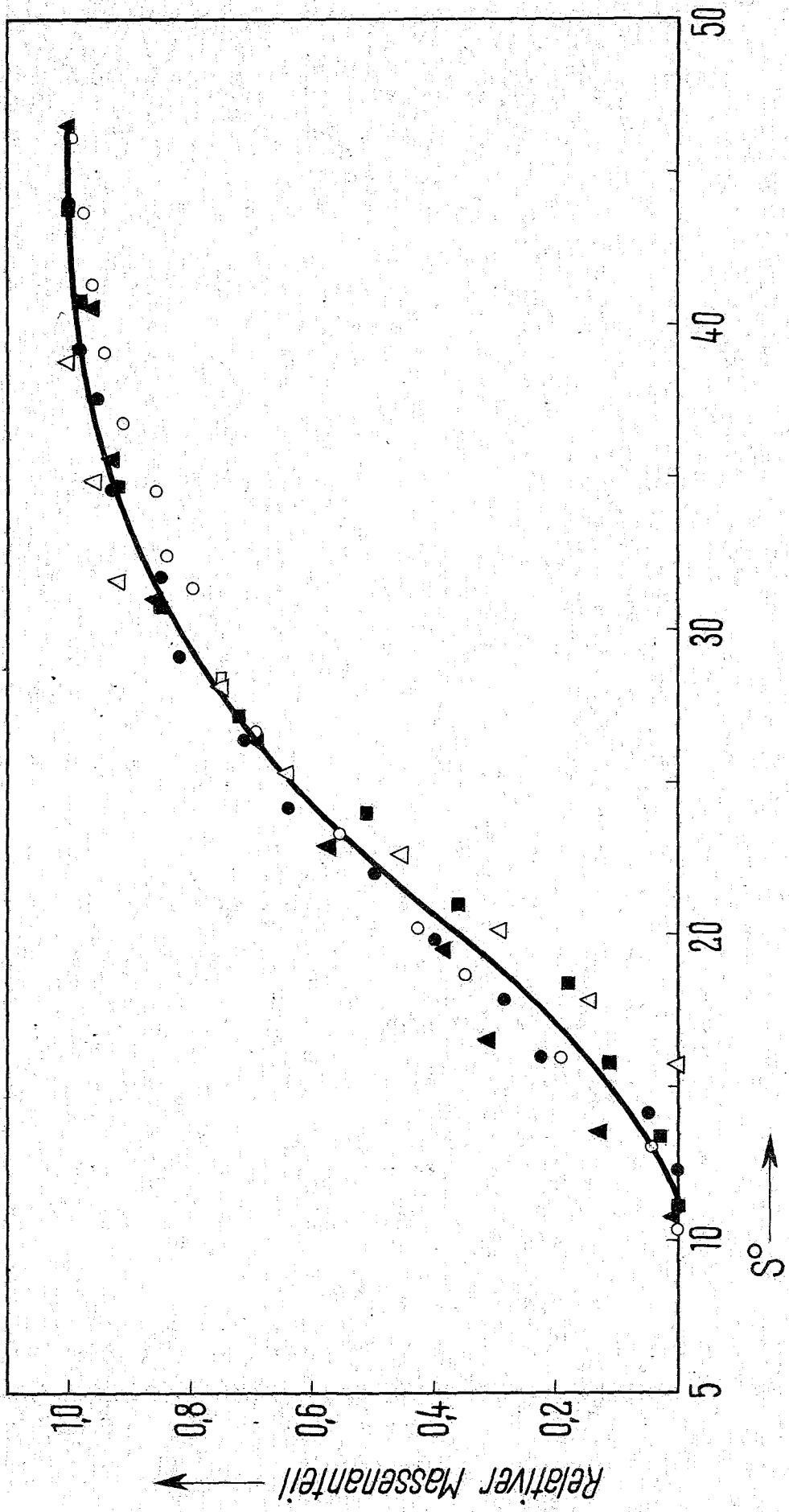


Abb. 4: Bruchwahrscheinlichkeit nativer DNS nach
Bestrahlung im Nukleoprotein.

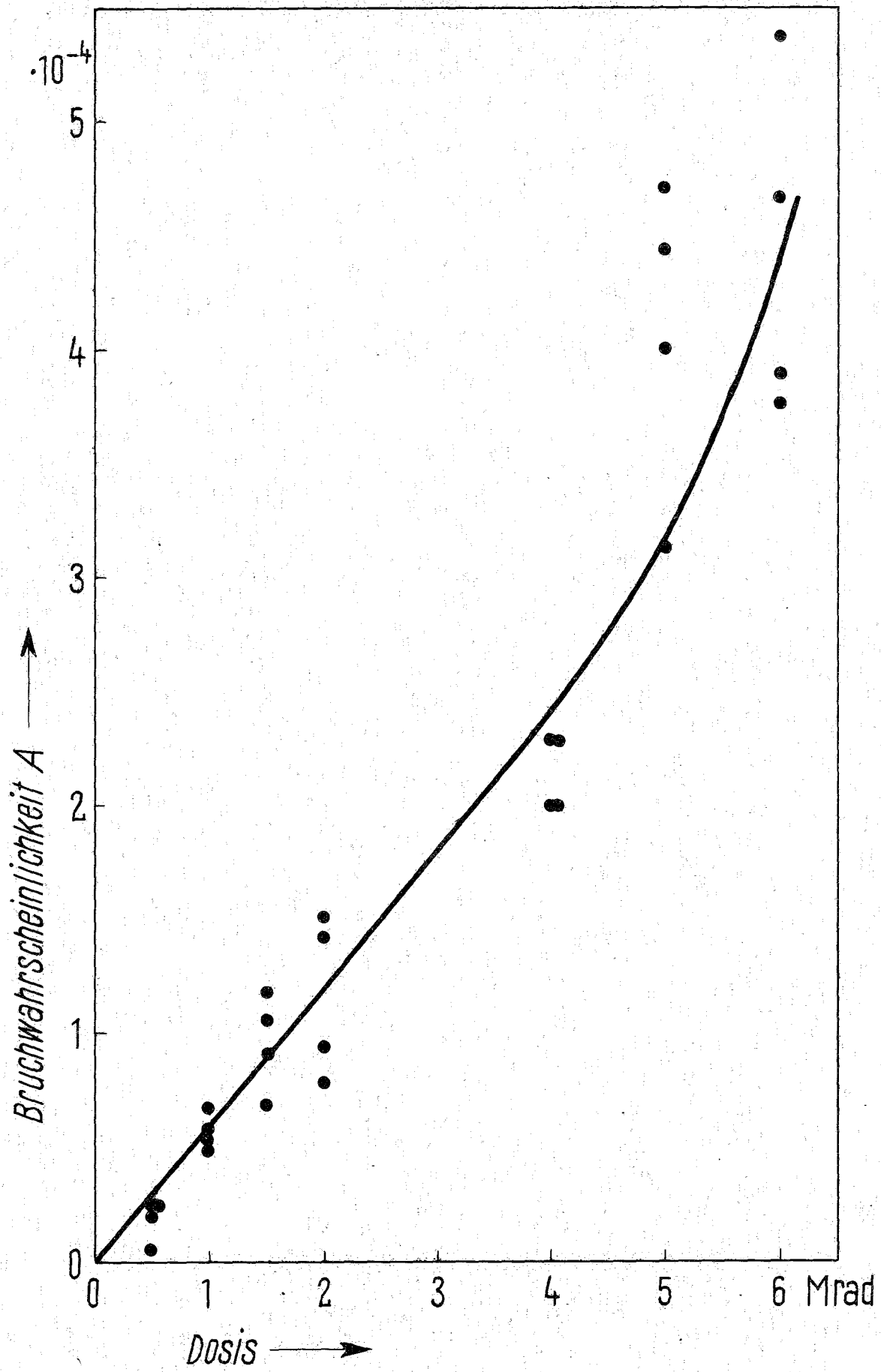


Abb. 5: Bruchwahrscheinlichkeit des Einzelstranges
der DNS nach Bestrahlung im Nukleoprotein.

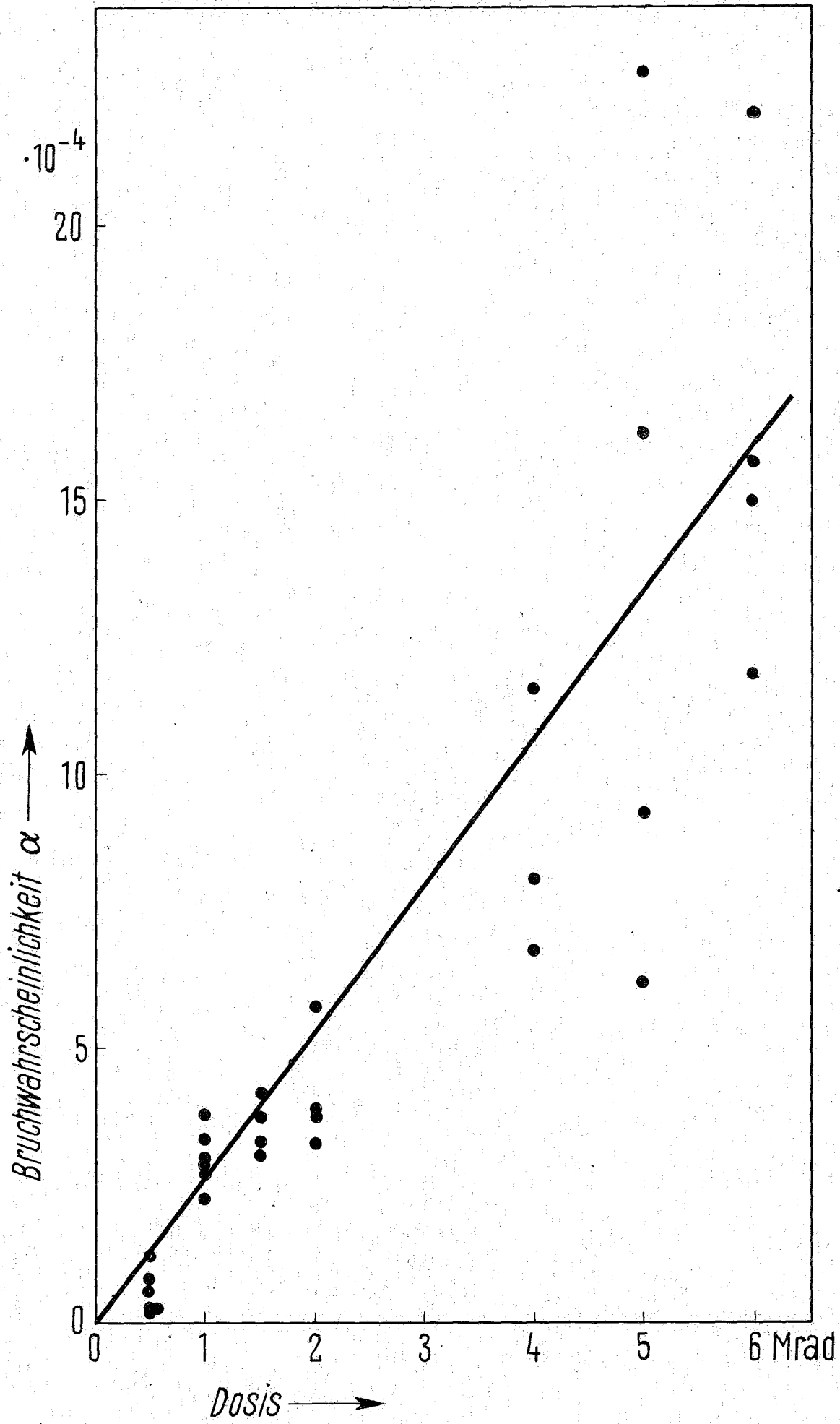


Abb. 6: Sedimentationsverteilung von DNS-Präparationen nach Bestrahlung des Nukleoproteins.

| | |
|-------------------|-----------|
| ————— | Kontrolle |
| - - - - - | 0,5 Mrad |
| - . - . - . - . - | 1,0 Mrad |
| ----- | 1,5 Mrad |
| — . . . — . . . — | 2,0 Mrad |
| —— — — — — | 4,0 Mrad |
| | 5,0 Mrad |
| —— — — — — | 6,0 Mrad |

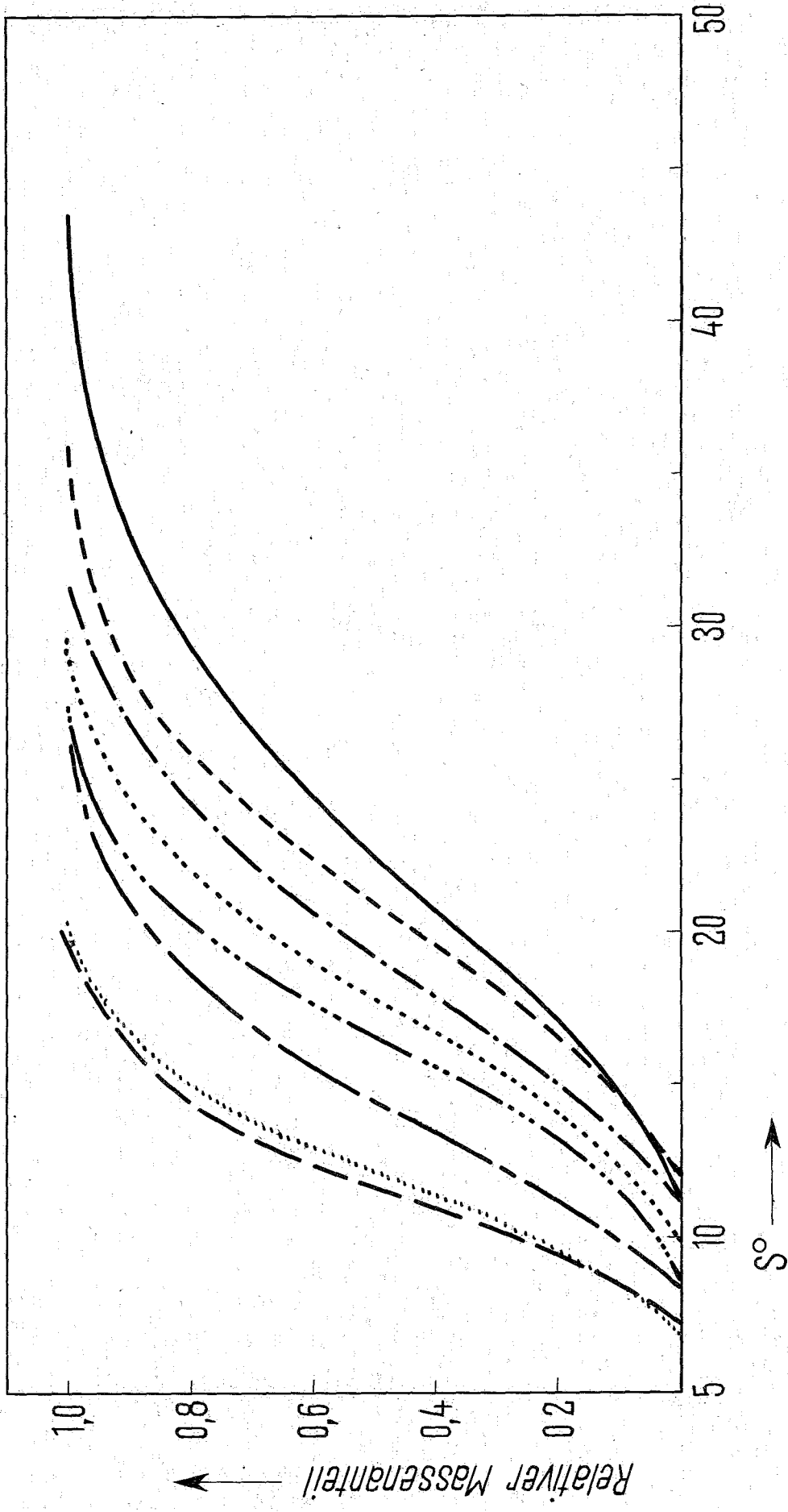


Abb. 7: Beziehung der reziproken Molekulargewichte zur Dosis bei nativer DNS zur Ermittlung der Vernetzungswahrscheinlichkeit.

$$\circ \frac{1}{M_n} \quad \bullet \frac{1}{M_w}$$

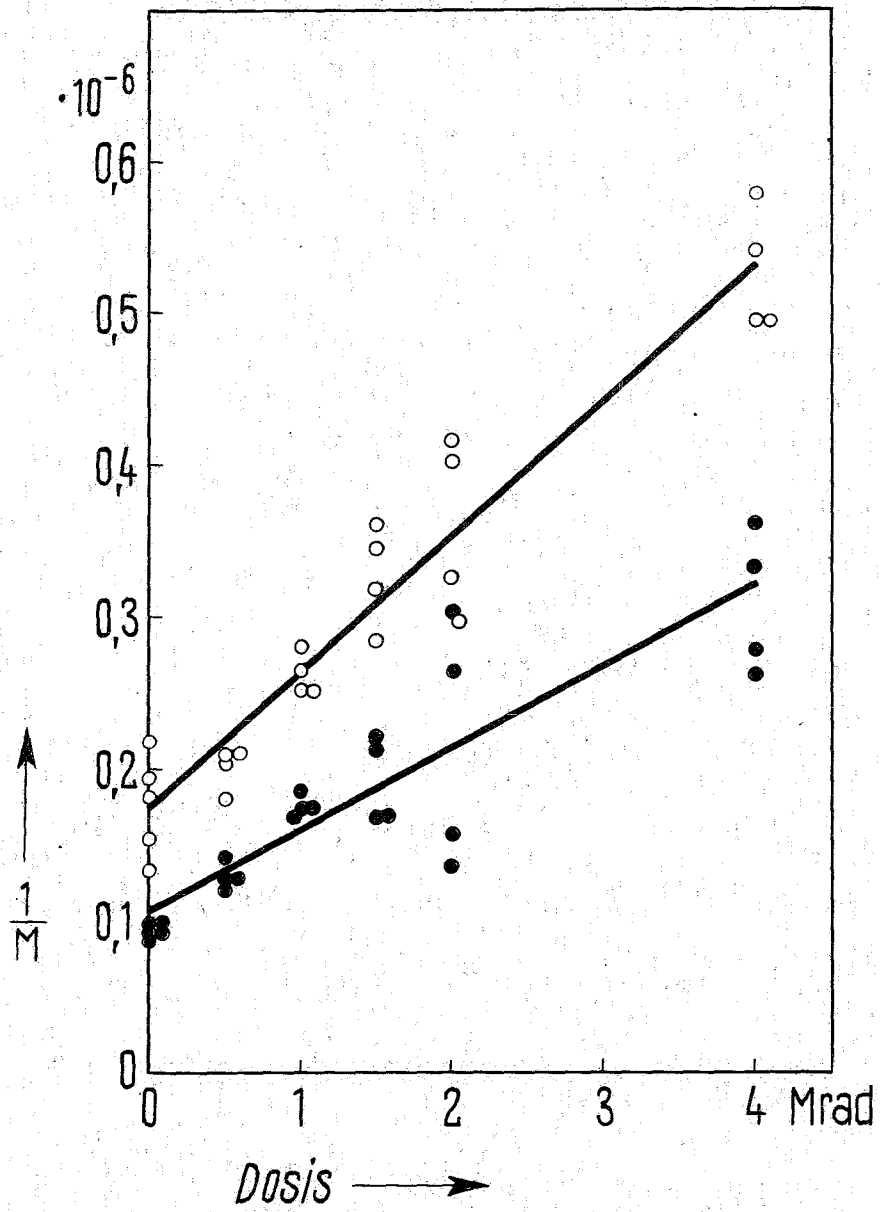


Abb. 8: Beziehung der reziproken Molekulargewichte zur Dosis bei denaturierter DNS zur Ermittlung der Vernetzungswahrscheinlichkeit.

$$\circ \frac{1}{M_n} \quad \bullet \frac{1}{M_w}$$

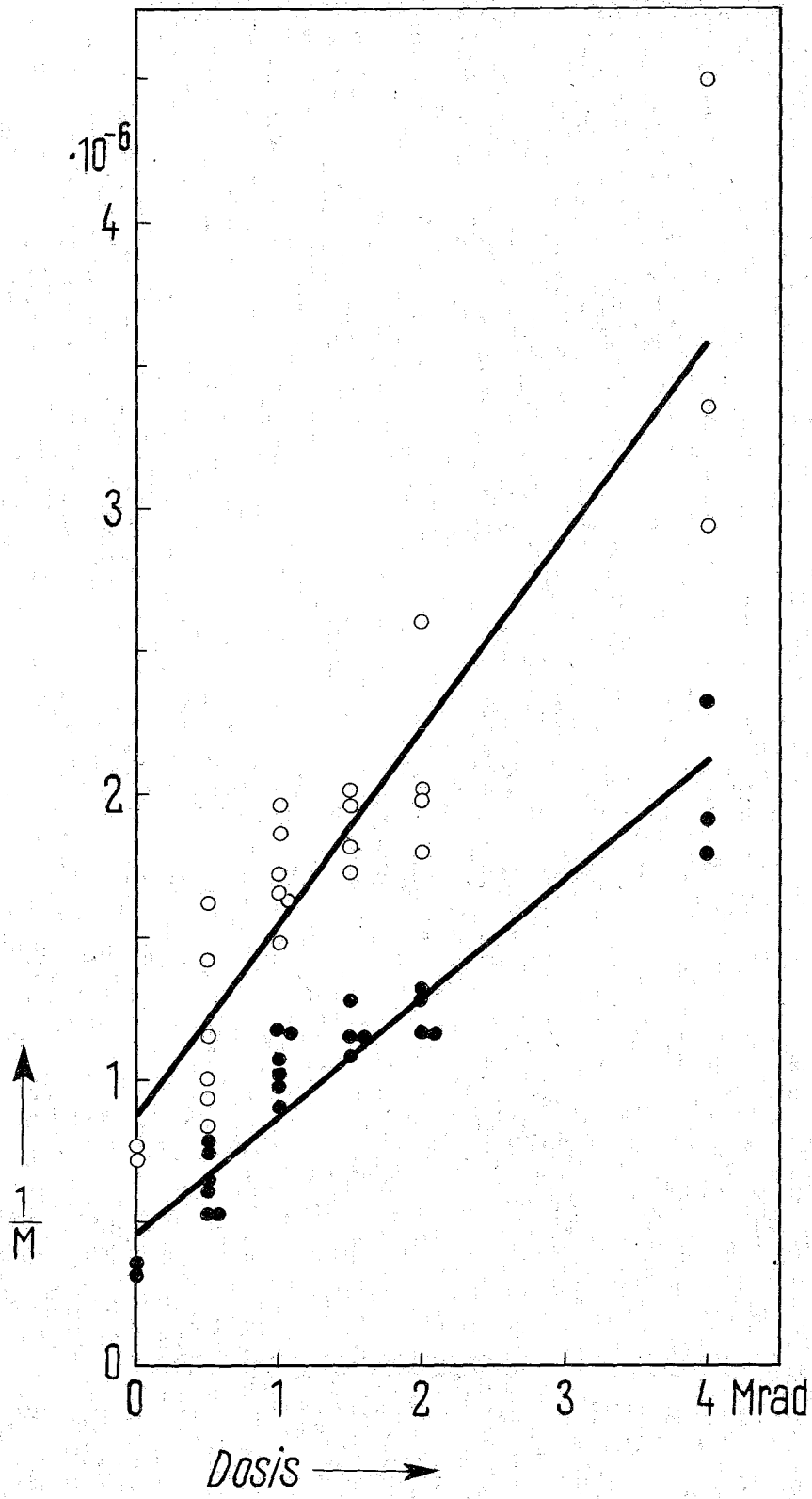


Abb. 9: Schmelzpunktprofile von DNS-Präparationen aus unbestrahltem und bestrahltem Nukleoprotein.

| | | |
|---------|------------|--------------------------------------|
| ●——● | Kontrolle, | $T_m = 84,8 \text{ } ^\circ\text{C}$ |
| □-----□ | 2 Mrad, | $T_m = 84,2 \text{ } ^\circ\text{C}$ |
| ■-.-.-■ | 4 Mrad, | $T_m = 82,9 \text{ } ^\circ\text{C}$ |
| Δ-----Δ | 6 Mrad, | $T_m = 82,2 \text{ } ^\circ\text{C}$ |

