

KFK-606

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

Juni 1967

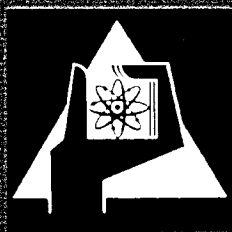
14. Aug 1967

KFK 606

Institut für Strahlenbiologie

Über die Strahlenempfindlichkeit der Wasserstoffbrücken
in der Desoxyribonukleinsäure

M. Ullrich



DEUTSCHES INSTITUT FÜR KERNFORSCHUNG KARLSRUHE

KARLSRUHE

Kernforschungszentrum Karlsruhe

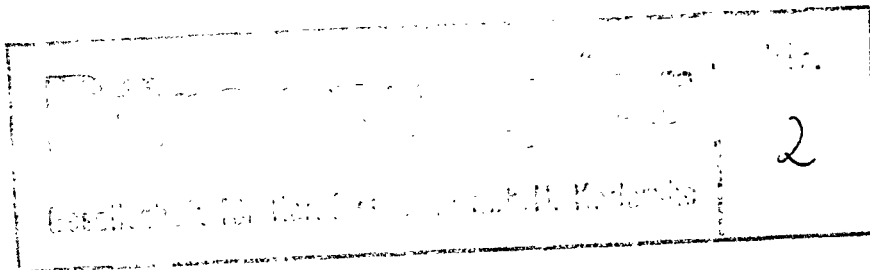
Juni 1967

KFK 606

Institut für Strahlenbiologie

Über die Strahlenempfindlichkeit der Wasserstoffbrücken
in der Desoxyribonukleinsäure

Marianne Ullrich



Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	6
I. Gewinnung von DNS durch Fällung mit Alkohol	6
II. Gewinnung von DNS ohne Fällung	7
III. Qualitätsprüfungen für die DNS-Präparation	8
1. Bestimmung der Konzentration	9
2. Bestimmung des Proteingehaltes	11
3. Bestimmung des RNS-Gehaltes	11
4. Messungen zur Bestimmung des Molekulargewichtes	12
5. Schmelzpunktbestimmungen	17
IV. Physikalische und chemische Untersuchungsmethoden	18
1. Bestrahlung mit ^{60}Co - γ -Strahlen	18
2. Bestrahlung mit ultraviolettem Licht	18
3. Degradierung mit Ultraschall	18
4. Enzymatische Degradierung	19
5. Depurinisierung	19
6. Adsorptionschromatographie	20
V. Durchführung und Auswertung der Versuche	22
C. Ergebnisse	23
I. Fraktionierung von DNS	23
II. Bindung bestrahlter DNS an die MAK-Säule	25
1. Bestrahlung nativer DNS	25
2. Bestrahlung degradiertes DNS	26
3. Degradierung bestrahlter DNS	26
4. Bestrahlung von DNS als Gel	27
5. Bestrahlung mit ultraviolettem Licht	28
6. Depurinisierung	29
7. Gegenüberstellung der Ergebnisse aus C. II. 1., 5. und 6.	29
III. Schmelzpunktbestimmungen	30
IV. Enzymatische Degradierung	31
V. Elution mit 2 N NH_3	33
D. Diskussion	34
E. Zusammenfassung	40
F. Literaturverzeichnis	41

A. Einleitung

Eine entscheidende biologische Wirkung ionisierender Strahlen ist die Hemmung der Zellteilung und des Zellwachstums. Wesentlich für das Zustandekommen dieses Strahlenschadens ist die Veränderung des Erbgutes. Die Nukleinsäuren als Träger der genetischen Information spielen hierbei eine zentrale Rolle.

Die Bedeutung der Desoxyribonukleinsäure (DNS) für die biologische Strahlenreaktion zeigt ein Versuch mit Mikroorganismen (DAVIS 1953). Bei Bestrahlung von Bakteriophagen mit niederenergetischen Elektronen, deren Reichweite man genau bestimmen konnte, wurden zwei Zonen von unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit erkennbar: Während die Schädigung der äußeren Proteinhülle die Aktivität des Phagen kaum beeinflusste, erfolgte bei einer bestimmten Eindringtiefe der Elektronen ein starker Aktivitätsabfall. Man konnte aufgrund dieser Untersuchungen die Größe des strahlenempfindlichen Bereichs des Phagen bestimmen; sie war identisch mit dem Volumen der Desoxyribonukleinsäure.

Ein Vergleich von Mikroorganismen und Säugetierzellen zeigt, welchen Einfluß das Volumen der DNS auf die Strahlenempfindlichkeit einer Zelle in Bezug auf ihre Teilungsfähigkeit hat. Die Säugetierzelle, die wegen ihres komplizierten genetischen Informationsgehaltes über eine größere DNS-Menge verfügt, ist zehnmal strahlenempfindlicher als ein Bakterium. Schon bei einer Dosis von 50 R, bei der Chromosomenbrüche zu beobachten sind, ist die Teilung einer diploiden menschlichen Zelle unterbunden; der Zellkern bleibt in der Prophase der Mitose stehen. So können verhältnismäßig kleine Strahlendosen beträchtliche biologische Strahlenschäden bewirken, die vermutlich nur durch sehr geringe Veränderungen an der DNS-Struktur bedingt sind. Mit chemischen Methoden lassen sich diese aber erst nachweisen, wenn man die Zellen mit sehr hohen Dosen bestrahlt; hier können jedoch sekundäre, d.h. stoffwechselbedingte Reaktionen an der DNS nicht ausgeschlossen werden.

Es ist deshalb zweckmäßig, die verschiedenen strahlenbedingten Reaktionen an der DNS in wässrigen Lösungen zu untersuchen.

Bei der Bestrahlung von DNS-Lösungen kommt weniger die im DNS-Molekül direkt absorbierte, sondern vor allem die im Lösungsmittel absorbierte Strahlenenergie zur Wirkung. Hier führen die im Wasser entstehenden Reaktionsprodukte zu Radikalen im Makromolekül und dann zu bleibenden chemischen Veränderungen. Diese Art der Strahlenwirkung wird als indirekte Wirkung bezeichnet. Die direkte Strahlenwirkung kann man dagegen eindeutig nur nach Bestrahlung im trockenen Zustand bestimmen. Da wir es bei biologischen Objekten meist mit wasserhaltigen Systemen zu tun haben, müssen wir bei in vivo Bestrahlungen mit beiden Strahlenwirkungen rechnen.

Die primäre und sekundäre Struktur der DNS bietet einen Anhalt für die Untersuchung und Erklärung von Strahlenschäden.

Abb. 1

Abbildung 1 zeigt einen kurzen Abschnitt eines DNS-Moleküls. Es hat die Form einer Doppelhelix aus zwei Polynukleotidketten, in denen Purin- und Pyrimidinbasen in einer spezifischen Sequenz angeordnet und durch Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft sind. Zwischen den Basen Adenin und Thymin werden zwei, zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrücken angenommen. In diesem Zustand wird das DNS-Molekül als nativ bezeichnet. Eine DNS mit dem Molekulargewicht von 10^7 baut sich aus 16 500 Nukleotidpaaren auf.

Extreme pH-Bedingungen oder hohe Temperaturen vermögen die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen aufzulösen, so daß sich die beiden Einzelstränge entspiralisieren und trennen. Eine solche DNS nennt man denaturiert. Der allmähliche Anstieg der Extinktion bei 260 nm während der Denaturierung mit steigender Temperatur wird als Schmelzkurve bezeichnet; die Extinktionserhöhung wird hyperchromer Effekt genannt.

Durch Enzyme, mechanische Kräfte, Säuren oder alkalische Agentien können chemische Bindungen in beiden Nukleotidketten so gebrochen werden, daß das Molekül in kürzere Stücke zerlegt wird, die man dann als degradierte DNS bezeichnet. Dabei kann die doppelsträngige, native Form (durch die Wasserstoffbrücken stabilisiert) erhalten bleiben oder aber eine gleichzeitige Denaturierung eintreten.

Neben den recht gut untersuchten strahlenchemischen Reaktionen an den isolierten Nukleinsäurebausteinen weiß man noch verhältnismäßig wenig über die Strahlenschäden an der DNS selbst. Im folgenden sollen einige Veränderungen der makromolekularen Struktur der DNS, wie sie nach Bestrahlung in vivo sowie in vitro gefunden wurden, kurz umrissen werden.

Die ersten physikochemischen Befunde an röntgenbestrahlter DNS bezogen sich auf das Absinken der Viskosität mit steigender Dosis. Gleichzeitig wurde die Freisetzung terminaler Phosphatgruppen beobachtet, was auf eine strahlenbedingte Degradierung der DNS hindeutete (BUTLER 1956, 1959). Die Phosphatfreisetzung ließ jedoch auf eine größere Anzahl von Brüchen schließen als die Abnahme der Viskosität. Hieraus ergab sich, daß nach Bestrahlung sowohl Brüche in der Nukleotid-Einzelkette als auch in der Doppelkette auftreten, von denen letztere die viskosimetrisch meßbare Degradierung verursachen.

Die Brüche in der Einzelkette können jedoch erfaßt werden, wenn man die beiden Stränge durch schonende Denaturierung voneinander trennt. Mit Hilfe der Molekulargewichtsverteilung von nativer und denaturierter DNS ermittelte HAGEN (1967) die Zahl der strahleninduzierten Einzel- und Doppelbrüche pro DNS-Molekül. Ein Doppelbruch entsteht nur dann, wenn zwei Einzelbrüche sich genau gegenüber liegen oder durch höchstens drei Nukleotidpaare voneinander getrennt sind. Ein weiterer Strahlenschaden ist die Aggregation von Molekülen, d.h. eine Vernetzung benachbarter Helices, die man als Rekombination von Makroradikalen deuten kann. Diese

von ALEXANDER und LETT (1960) durch das unterschiedliche Verhalten von Viskosität und Sedimentation nach Bestrahlung von DNS-Gelen nachgewiesenen Vernetzungen wurden von HAGEN und WELLSTEIN (1965) nach Bestrahlung trockener DNS unter Stickstoff, Sauerstoff und im Vakuum eingehend untersucht. Bei der Bestrahlung im Vakuum ist jedes dritte Ereignis an der Einzelkette eine Vernetzung, während unter Sauerstoff die Zahl der Brüche gegenüber den Vernetzungen ansteigt.

Einen wesentlichen Teil der bekannten Strahlenreaktionen an der DNS macht die Zerstörung von Basen aus. Diese Zerstörung wird für den Absorptionsverlust der DNS nach Bestrahlung verantwortlich gemacht. Die Desaminierung, die Ringöffnung an Purinen und die Peroxydbildung am Pyrimidinring sind von WEISS (1964) an isolierten Basen nachgewiesen und auch nach Bestrahlung makromolekularer DNS beschrieben worden. Eine besondere Bedeutung kommt der Basenzerstörung bei der Hemmung der Matrizenfunktion der DNS im RNS-Polymerasesystem zu (ZIMMERMANN u.a. 1964, HAGEN u.a. 1965).

Außer Brüchen, Vernetzungen und Basenschädigungen wurde auch die Strahlenempfindlichkeit der Wasserstoffbrücken in der nativen DNS untersucht. COX u.a. (1958) konnten nach Bestrahlung gelöster DNS eine Verschiebung der Titrationskurven nachweisen, die auf einer Zunahme basischer Gruppen im DNS-Molekül beruht. Sie berechneten daraus den Prozentanteil zerstörter Wasserstoffbrücken. EMMERSON u.a. (1960) beobachteten einen Extinktionsanstieg der DNS nach Bestrahlung, der mit dem hyperchromen Effekt zu vergleichen ist und damit auf eine Denaturierung hindeutet. Eine Veränderung der Absorption nativer DNS nach Bestrahlung haben auch COLLYNS u.a. (1965) bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Aus dem Grad der Hyperchromizität bei pH 8,5 und der Absorptionsabnahme bei pH 2,5 berechneten sie die Zahl der gebrochenen Wasserstoffbindungen pro 100 eV absorbierter Strahlenenergie zu 6,6. HAGEN (1962) sowie HAGEN und WILD (1964) untersuchten diese strahlenbedingte Denaturierung

unter Heranziehung verschiedener Kriterien. Mit der Bestimmung des Absorptionsmaximums, durch eine Veränderung der Schmelzdiagramme und aufgrund der Formaldehydreaktion zeigen sie, daß nach einer Strahlendosis, die das Molekulargewicht auf ein Zehntel herabsetzt, 50 % aller Wasserstoffbrücken gespalten sind.

Mit diesen Untersuchungen war das Aufbrechen von Wasserstoffbrücken in der DNS im wesentlichen jedoch nur qualitativ und summarisch erfaßt worden und es blieb unberücksichtigt, ob einzelne Moleküle vollständig, andere dagegen nicht denaturiert sind oder ob partiell denaturierte Moleküle vorliegen. Bei der Suche nach Wegen, die einzelnen DNS-Moleküle in ihrer Form und Konfiguration näher zu untersuchen, erhob sich die Frage nach der Fraktionierung bestrahlter DNS. BENDICH u.a. (1958) konnten mit einer Zellulose-Ionenaustauscher-Säule DNS nach dem Molekulargewicht und dem Basenverhältnis fraktionieren sowie 5-Bromuracilmarkierte von normaler DNS trennen. Für unsere Versuche mit bestrahlter DNS schien jedoch die von MANDELL und HERSHEY (1960) beschriebene Säule aus methyliertem Albumin auf Kieselgur (MAK-Säule) geeigneter zu sein.

Mit Hilfe der MAK-Säule sind folgende Fraktionierungen möglich:

1. Trennung von nativen und denaturierten DNS-Molekülen.
2. Trennung nach dem Molekulargewicht.
3. Trennung nach der Basenzusammensetzung.

HERSHEY u.a. (1963) zufolge ist die Bindung an die MAK-Säule ein sehr empfindliches Kriterium zur Erkennung denaturierter DNS-Moleküle. Es lassen sich schon Denaturierungen erfassen, die nur auf einen kurzen Abschnitt im Molekül begrenzt sind und sich noch nicht in einer Veränderung der Schmelzkurve oder der Hyperchromizität bemerkbar machen. Die genannten Autoren untersuchten diese "lokalen Denaturierungen", die bei makromolekularer DNS durch Scherkräfte verursacht werden können, auf ihr spezifisches chromatographisches Verhalten.

Wie im folgenden gezeigt wird, können durch die Chromatographie an der MAK-Säule auch einzelne, durch ionisierende Strahlung erzeugte umschriebene Zonen mit offenen Wasserstoffbrücken (lokale Denaturierungen) erfaßt werden.

B. Material und Methoden

Die für unsere Versuche benötigte DNS gewannen wir aus dem lymphozytenreichen Kalbsthymusgewebe nach den im folgenden beschriebenen Isolierungsmethoden. Die DNS wurde dabei durch geeignete Detergentien aus der Zelle befreit und von den Kernproteinen abgetrennt. Mit 1/10 M NaCl-Lösung unter Zusatz von Natriumcitrat (zur Hemmung der Desoxyribonuklease) erhielten wir die DNS als Natriumsalz. Beim Isolierungsprozeß war vorsichtige Handhabung, d.h. Vermeidung von starken Scherkräften und hohen Temperaturen, für die Qualität der DNS von großer Bedeutung.

I. Gewinnung von DNS durch Fällung mit Alkohol

Das Thymusgewebe wurde unmittelbar nach dem Schlachten auf Trockeneis gelegt und tiefgefroren vom Schlachthof bezogen. Die weitere Aufbewahrung erfolgte bei -20°C . Nach der Methode von KAY u.a. (1952) wurden 10 g Thymusgewebe in 100 ml 0,14 M NaCl + 0,01 M Na-Citrat-Lösung mit einem Ultraturrax zerkleinert und bei 0°C 10 min mit 5000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde 3 mal mit NaCl + Na-Citrat-Lösung gewaschen und danach in 360 ml dieser Lösung aufgenommen. Nach Zugabe von 40 ml 5 %igem Natriumdodecylsulfat (Duponol) wurde die Gesamtpräparation auf 1 M NaCl gebracht, was durch die Lockerung des Nukleoproteinverbandes zu einem Anstieg der Viskosität führt. Die durch diese Behandlung denaturierten und an das Dodecylsulfat komplexartig gebundenen Proteine wurden an Kieselgurpulver adsorbiert und abzentrifugiert (30 min mit 9000 Upm). Den Überstand versetzten wir zu gleichen Teilen mit 96 %igem Alkohol, wodurch die DNS gefällt wird. Erst bei weiterer Zugabe von Alkohol (etwa bei einem Verhältnis von 2:1) fällt auch die RNS aus (LITTLETON und PETERSEN 1964). Auf diese Weise war

sie gut von der DNS zu trennen. Die in der Lösung sichtbar werdenden weißen DNS-Fasern wurden in Form eines Kokons auf einen Glasstab gewickelt, nach leichtem Auflockern mit zwei Pinzetten in Alkohol, Aceton und Äther gewaschen und an der Luft getrocknet.

Um ein DNS-Präparat mit möglichst niedrigem Proteingehalt zu erhalten, resuspendierten wir diese sog. Roh-DNS in 180 ml 0,01 M NaCl während 10 bis 16 Stunden und homogenisierten die Lösung mit einem Handhomogenisator. Danach wurde sie auf 1 M NaCl eingestellt und nochmals mit 20 ml Duponol behandelt. Nach dem Zentrifugieren folgte wiederum die Fällung mit Alkohol. Anschließend wurde die DNS wie vorher gewaschen und getrocknet. Durch mehrfaches Umfällen konnte der Proteingehalt auf 0,5 % reduziert werden. Die Ausbeute an trockener DNS betrug im Mittel 200 bis 300 mg pro 10 g Thymus.

Diese durch Fällung isolierte DNS wird im folgenden mit "Duponol-DNS" bezeichnet.

Durch Sedimentationsanalysen war gezeigt worden (HAGEN 1967), daß durch mehrfache Fällung die Größenverteilung der DNS-Moleküle immer breiter wurde; daher entschlossen wir uns, für die vorliegenden Versuche vor allem die DNS-Präparationsmethode ohne Fällung heranzuziehen.

II. Gewinnung von DNS ohne Fällung

Nach der von COLTER u.a. (1962) beschriebenen Isolierung der DNS mit einer phosphatgepufferten Salzlösung und wassergesättigtem Phenol verfahren wir folgendermaßen:

2 g Thymusgewebe wurden mit 34 ml 1,0 M NaCl + 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,3 und 4 ml 5 %igem Natriumdesoxycholat im Handhomogenisator bei + 4°C zerkleinert. Mit 40 ml 75 %igem, frisch destilliertem Phenol wurde das Homogenat 30 min gerührt und bei 0°C 30 min lang mit 12 000 Upm zentrifugiert.

Der größere Anteil der DNS ist in der wässrigen Phase gelöst, die mittels einer Rekordspritze von der Phenolphase abgehoben wurde. Das denaturierte Zellprotein, das sich bei der Zentrifugierung in der Interphase zwischen der wässrigen und der phenolischen Schicht sammelt, enthält jedoch nicht zu vernachlässigende Mengen an DNS. Diese weiße Proteinschicht mußte deshalb mit 20 ml 1 M NaCl und 20 ml Phenol nochmals 10 min gerührt werden. Nach dem Zentrifugieren wurde die DNS-haltige Phase wie zuvor abgehoben und mit der ersten vereinigt.

Die DNS-Lösungen behandelten wir zur besseren Enteiweißung dann noch ein- bis zweimal mit Phenol. Das in der wässrigen Phase gelöste Phenol wurde im Scheidetrichter 4 bis 5 mal mit Äther ausgeschüttelt, der gelöste Äther im Rotationsverdampfer beseitigt. Um eine Schädigung der DNS durch Fällung zu vermeiden, wurde die erhaltene DNS-Lösung 10 bis 16 Stunden gegen 0,2 M NaCl pH 7 dialysiert.

Zur Entfernung der RNS inkubierten wir die Lösung 4 h bei 37 °C mit pankreatischer Ribonuklease A (25 γ /ml). Eine weitere Behandlung mit 75 %igem Phenol entfernte das Enzymprotein. Darauf folgte eine 10 bis 16 stündige Dialyse gegen 0,01 M NaCl + 0,01 M KCl pH 7. Die K⁺-Ionen begünstigten die Dialyse der Ribonukleotide. Wir versuchten, durch die Erhöhung der KCl-Konzentration den RNS-Gehalt der Präparation zu erniedrigen; dies gelang jedoch nicht. Die K⁺-Ionen wurden durch ein- bis zweifachen Wechsel des Dialysebades wieder beseitigt. Wir erhielten die DNS in 0,01 M NaCl Lösung mit durchschnittlichen Konzentrationen von 0,5 bis 0,8 mg/ml und in einer Ausbeute von 20 bis 30 mg pro 2 g Gewebe.

III. Qualitätsprüfungen für die DNS-Präparationen

Zur weiteren Planung der Versuche war es wichtig, die Qualität der DNS zu bestimmen, da diese durch unvorsichtige Isolierungsprozesse leicht beeinflußt werden konnte.

1. Bestimmung der Konzentration

Da die drei Bestandteile: Basen, Zucker und Phosphatgruppen in der DNS in äquimolarem Verhältnis vorliegen, führt die quantitative Bestimmung eines jeden Bestandteils allein bereits zur Ermittlung der Konzentration. Die folgenden verschiedenen Bestimmungsmethoden wurden je nach den experimentellen Gegebenheiten angewendet.

a) Absorptionsmessung

Gewöhnlich genügt zur Bestimmung der Konzentration die für die Basen spezifische Absorption bei 260 nm, die jedoch durch Verunreinigungen zu hohem Protein- oder RNS-Gehalt gestört sein kann. Diese Absorption gibt nur einen relativen Wert der Konzentration an, eine absolute Messung ist nur mit Hilfe der Bestimmung des Phosphatgehaltes möglich. Für den Vergleich von Phosphatgehalt und Extinktion verwendeten wir besonders gut gereinigte DNS. Der aus dem Phosphatgehalt ermittelte Extinktionsfaktor für die Kalbshymus DNS mit etwa 40 % Cytosin und Guanin beträgt $22,0 \text{ cm}^2/\text{mg}$.

b) Kolorimetrische Bestimmung des Phosphatgehaltes

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes führten wir nach der Methode von CHEN u.a. (1956) durch. Das Chen-Reagenz besteht aus: 1 Vol. 6 N H_2SO_4 , 2 Vol. H_2O , 1 Vol. 2,5 %iges Ammoniummolybdat + 1 Vol. 10 %ige Ascorbinsäure, es ist nur einen Tag haltbar. Das organische Phosphat mußte zunächst in anorganisches Phosphat umgewandelt werden, und zwar durch Aufschluß mit alkoholischer Magnesiumnitrat-Lösung. Von einer DNS-Lösung mit der Konzentration von etwa 0,1 bis 1,0 mg/ml wurden 0,05 ml mit 0,05 ml 10 %iger alkoholischer $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung solange eingedampft, bis sich keine braunen Dämpfe mehr entwickelten. Das entstandene Orthophosphat wurde quantitativ in 0,3 ml 1 N HCl aufgenommen, 15 min im Wasserbad gekocht, danach mit 1,7 ml H_2O aufgefüllt und zu gleichen Teilen mit dem Chen-Reagenz versetzt, wodurch es in einen Molybdänkomplex überführt wird.

Dieser Komplex wird mit Ascorbinsäure in Gegenwart von konz. H_2SO_4 zu Molybdänblau reduziert. Nach 1 bis 1,5 h war das Gleichgewicht dieser Reaktion, bei der das Phosphat eigentlich nur eine katalytische Wirkung hat, erreicht, und die Farbintensität konnte bei 820 nm photometrisch gemessen werden. Aus einer Standardkurve für diese Reaktion mit KH_2PO_4 konnte der gesuchte Phosphatgehalt ermittelt werden. Der Anteil des Phosphors am Molekulargewicht der Kalbs-thymus DNS beträgt etwa 10 %.

c) Kolorimetrische Bestimmung der Desoxyribose in DNS

Wenn die DNS in Phosphatpuffer gelöst vorlag und die Absorptionsmessung nicht zuverlässig erschien, bestimmten wir den Desoxyribosegehalt nach den kolorimetrischen Methoden von DISCHE (1930), auch in der Abwandlung von BURTON (1956) oder WEBB u.a. (1955).

Nach der Vorschrift von DISCHE wird die DNS-Testlösung (10 - 200 $\mu g/ml$) mit einem stark essigsäuren Diphenylaminreagenz unter Zusatz von konz. H_2SO_4 im Verhältnis 1:2 versetzt und für 5 min in ein kochendes Wasserbad gestellt. Das Reagenz besteht aus 1 g Diphenylamin + 98 ml Eisessig + 2 ml konz. H_2SO_4 . Bei dieser Behandlung werden die an Purinbasen gebundenen Desoxypentosen hydrolysiert und mit Diphenylamin zu einer blaugefärbten Komplexbindung umgesetzt, die bei 540 nm photometriert werden kann. Als Standard benutzten wir eine gereinigte DNS-Lösung, deren Phosphatgehalt bekannt war. Die nach BURTON veränderte Dische-Reaktion, bei der Acetaldehyd zugesetzt wird, erwies sich wegen ihrer höheren Empfindlichkeit bei geringer DNS-Konzentration als besonders geeignet.

Die Desoxyribosebestimmung nach WEBB erfolgte mit Nitrophenylhydrazin. Die DNS-Lösung wird zu gleichen Teilen mit 10 %iger Trichloressigsäure versetzt und 30 min bei 90 °C im Wasserbad degradiert, danach mit dem 0,5 %igen, alkoholischen p-Nitrophenylhydrazin-Reagenz in einem Verhältnis von 2,5 ml Testlösung zu 0,1 ml Reagenz gemischt

und nochmals 20 min bei 90 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das überschüssige Nitrophenylhydrazin mit Essigsäurebutylester (etwa 5 ml) 5 min lang ausgeschüttelt, die organische Phase abgehoben und verworfen. Von der unteren wässrigen Phase entnahmen wir 1,5 ml und versetzten diese Menge in einer Meßküvette mit 1 ml 1 N NaOH. Nach raschem Durchmischen mußte sofort bei 546 nm photometrisch gemessen werden. Aus einer Eichkurve mit gereinigter DNS ermittelten wir die Konzentration.

2. Bestimmung des Proteingehaltes

Die Methode von LOWRY u.a. (1951), die sich für geringe Proteinmengen, wie sie bei einer DNS-Präparation auftreten, besonders gut eignet, basiert auf dem Prinzip der Folin-Reaktion.

Von gefällter DNS ließen wir 6 mg in 0,6 ml H₂O über Nacht quellen und 2 h bei 90 °C im Wasserbad degradieren, um eine homogene Lösung zu erhalten. Von gelöster DNS nahmen wir 0,6 ml oder ein Vielfaches davon; die Probe sollte 5 bis 100 µg Protein enthalten. Zu den Proben wurden je 3 ml alkalischer Kupfersulfat-Natriumtartrat-Lösung zugesetzt und gut gemischt. Diese Lösung besteht aus 50 ml 2 % Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH und 1 ml 0,05 % CuSO₄ + 1 % Natriumtartrat. Nach 10 min wurde 0,3 ml phenolisches Folin-Ciocalteu-Reagenz rasch zugefügt und in 1 bis 2 sec gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Testlösung bei 691 nm photometrisch gemessen. Der Proteingehalt konnte aus einer Standardkurve mit Rinderserumalbumin abgelesen werden.

3. Bestimmung des RNS-Gehaltes

Der RNS-Gehalt von DNS-Präparaten wurde mit der Orcinreaktion auf Ribose bestimmt (VOKIN und COHN 1954). 2 g Orcin und 1,35 g Ferriammoniumsulfat wurden in 50 ml Wasser gelöst. Vor dem Gebrauch mußte diese Stammlösung mit 17 Teilen konz. HCl und 3 Teilen Wasser verdünnt werden. Das käufliche Orcin wurde einmal in Aethanol umkristallisiert.

Eine Voraussetzung für die Genauigkeit der Bestimmung ist jedoch, daß die DNS möglichst beseitigt wird, da sie ebenfalls, wenn auch nur schwach, mit dem Orcinreagenz eine Färbung gibt. Zu diesem Zweck denaturierten wir 1,8 ml DNS + 0,2 ml 1 N NaOH bei 90 °C und fällten sie anschließend mit 0,25 ml 1 N HCl (pH 2). Durch die Alkalibehandlung wird die RNS spezifisch hydrolysiert. Der Niederschlag konnte abzentrifugiert und der Überstand auf Ribose untersucht werden.

1 ml dieser Testlösung, die nicht mehr als 50 µg Ribose enthalten sollte, wurde mit 3 ml Orcin-Reagenz 20 min in ein kochendes Wasserbad gestellt und nach Abkühlen auf Zimmertemperatur bei 660 nm photometriert. In gleicher Weise wie beim Diphenylamintest auf Desoxyribose werden unter diesen Bedingungen nur die an Purine gebundenen Zucker erfaßt. Als Standard benutzten wir "RNA yeast" (Worthington) nach NaOH-Hydrolyse.

4. Bestimmung des Molekulargewichtes

Eine wichtige Qualitätsprüfung bei unseren Versuchen war die Bestimmung des Molekulargewichtes; dies erfolgte mit Hilfe der Viskositätsbestimmung und der Sedimentationsanalyse.

a) Viskositätsmessungen

Die Viskosität der DNS-Präparationen in wässriger Lösung wurde mit einem Drehviskosimeter nach HATSCHEK-COUETTE bestimmt, dessen Schergradient $8,4 \text{ sec}^{-1}$ betrug. Die gemessene Viskosität η wurde zu der Viskosität des reinen Lösungsmittels η_L in Beziehung gesetzt und so die spezifische Viskosität η_{sp} ermittelt.

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

Das Verhältnis der spezifischen Viskosität zur DNS-Konzentration (η_{sp}/c) gegen die Konzentration (c) aufgetragen und auf die Konzentration Null extrapoliert, ergab die Viskosität bei unendlicher Verdünnung $[\eta]$.

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c}$$

Wir erhielten für die Viskosität $[\eta]$ von "Phenol-DNS" in 0,01 M NaCl-Lösung Werte von 80 bis 170, wobei die Konzentration in $g/100\text{ cm}^3$ angegeben wurde. Da die DNS-Moleküle in höherer Ionenkonzentration eine Form annehmen, bei der die gegenseitige Behinderung abnimmt, ist die Viskosität in 0,1 M NaCl deutlich geringer, daher in größerer Verdünnung auch nicht so gut meßbar. Die in der Literatur angegebenen Werte beziehen sich aber in den meisten Fällen auf 0,1 bis 1,0 M Ionenkonzentration.

b) Sedimentationsbestimmungen

Die Sedimentation wurde in der analytischen Ultrazentrifuge (Modell Spinco E, Beckman) mittels der Absorption der DNS bei 260 nm untersucht. Die Temperatur betrug 20°C , die Konzentration der DNS wurde 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 (5 - 30 $\mu\text{g/ml}$). Die Ionenstärke der Lösungen betrug 0,2 M NaCl + 0,025 M Phosphatpuffer pH 7,3. Die denaturierten Proben enthielten zusätzlich 2 % Formaldehyd. Die Denaturierung der DNS-Proben erfolgte dabei durch eine kurze Alkalibehandlung und anschließende Neutralisierung unter Zugabe von Formaldehyd (DAVISON u.a. 1964).

Die Intensität der Schwärzung wurde mit dem Mikrodensitometer Analytrol (Beckman) registriert. Die Sedimentationskonstante S^0 wurde graphisch aus dem Verhältnis von $\frac{1}{S_{app}}$ *)

*) S_{app} = Sedimentationskoeffizient, der im Experiment bei der Konzentration c gemessen wurde, unkorrigiert für Verdünnungseffekt und Druckeffekt.

zur Konzentration c durch Extrapolation auf unendliche Verdünnung ($c = 0$) ermittelt. Nach HAGEN (1967) beträgt der Unterschied von S_{app} zu S^0 bei nativer DNS mit einem S -Wert von 20 nicht mehr als 12 % und ist bei degradierter sowie denaturierter DNS - mit einem S -Wert kleiner als 10 - vernachlässigbar klein. Für native Phenol-DNS erhielten wir Sedimentationsmittelwerte von 21 bis 33 S.

c) Molekulargewichtsbestimmungen

Für die Ermittlung der Molekulargewichte aufgrund der Viskosität allein richteten wir uns nach der in unserem Labor experimentell ermittelten graphischen Beziehung zwischen $M_{s\eta}$ und $[\eta]$ in 0,01 M NaCl. Das Molekulargewicht $M_{s\eta}$ wird dabei aus kombinierten Messungen von Sedimentation und Viskosität erhalten. Die Beziehung $[\eta]$ zu M stimmt mit der Angabe von LETT und STACEY (1960) weitgehend überein; hier wurde das Molekulargewicht unabhängig von der Viskosität mittels der Lichtstreuung bestimmt.

Für denaturierte DNS wurde aus den Darstellungen von EIGNER und DOTY (1965) die Beziehung $[\eta] = 3,11 \cdot 10^{-5} \cdot M^{0,912}$ entnommen. Für eine Viskosität von $[\eta] = 20$ konnten wir ein Molekulargewicht von $2,33 \cdot 10^6$ berechnen.

Die Bestimmung des Molekulargewichtes einer DNS-Probe ist jedoch aufgrund der Sedimentationskonstanten zuverlässiger als durch die Viskosität, insbesondere im Falle stark degradierter Proben. Zudem ist die Sedimentation weniger vom jeweiligen Ionenmilieu abhängig als die Viskosität, und die Fehlermöglichkeiten sind geringer.

Aus der Sedimentationskonstanten S^0 läßt sich für native DNS nach der von EIGNER und DOTY (1965) gegebenen Beziehung das Molekulargewicht wie folgt berechnen: $S^0 = 0,063 \cdot M^{0,37}$, für denaturierte DNS gilt nach HAGEN (1967) die Beziehung $S = 0,057 \cdot M^{0,37}$.

Bei homologen Polymeren, die sich nur in der Kettenlänge unterscheiden, kann man Viskosität und Sedimentation kom-

biniert zur Molekulargewichtsbestimmung heranziehen. Die allgemeine Beziehung für flexible Kettenmoleküle wurde von MANDELKERN u.a. (1952) in der folgenden Formel festgelegt:

$$M^{\frac{2}{3}} = \frac{s_0 [\eta]^{\frac{1}{3}} \cdot N \cdot \eta_0 \cdot 10^{-13}}{\beta (1 - \bar{v}\rho)}$$

M = Molekulargewicht

s_0 = Sedimentation bei unendlicher Verdünnung

$[\eta]$ = Viskosität bei unendlicher Verdünnung

η_0 = Viskosität des Lösungsmittels = $0,01 \text{ g cm}^{-1} \text{ sec}^{-1}$

\bar{v} = partielles spezifisches Volumen der gelösten DNS = $0,55 \text{ cm}^3/\text{g}$

ρ = Dichte des Lösungsmittels = $1,01 \text{ g/cm}^3$

β = ein experimenteller Wert, der für native und denaturierte DNS in gewissen Molekulargewichtsbereichen konstant ist: für native DNS $\beta = 2,5 \cdot 10^6$, für denaturierte DNS $\beta = 2,3 \cdot 10^6$

N = $6,0235 \cdot 10^{23}$

Diese Gleichung gilt sowohl für native als auch für denaturierte DNS unabhängig vom Lösungsmittel. Sie ist die Grundlage für die oben aufgeführten Beziehungen zwischen S , $[\eta]$ und M . Für eine native Phenol-DNS in 0,2 M NaCl mit $[\eta] = 65$ und $S^0 = 32,7$ ergab sich ein Molekulargewicht von $M_{S\eta} = 30 \cdot 10^6$. Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse stellen ein gemischtes Mittel des Molekulargewichtes dar. Zur Berechnung von Brüchen war die Verteilung der Molekulargewichte einer DNS-Probe sowie das sich daraus ergebende Zahlenmittel M_n (mittlere Kettenlänge) notwendig.

d) Bestimmung von Brüchen

Die Verteilung der Molekulargewichte MG_i ($1 < i < n$) läßt sich aus der Sedimentationsverteilung S_i berechnen. Diese ergab sich wiederum aus einer stufenweisen Auswertung des Gradienten in der Ultrazentrifugenzelle; Einzelheiten dieses

Verfahrens sind bei HAGEN (1967) und COQUERELLE u.a. beschrieben. Das Gewichtsmittel und das Zahlenmittel ergeben sich aus folgenden Beziehungen:

$$M_w = \sum_{i=1}^n m_i \cdot MG_i \quad \text{und} \quad M_n = \left[\sum_{i=1}^n \frac{m_i}{MG_i} \right]^{-1}$$

Der Massenanteil m_i wurde aus Δc_i in % der Gesamtkonzentration ermittelt; n ist die Zahl der Meßpunkte. Für eine native, unbehandelte Kontroll-DNS, für die wir ein S_{app} von 20,3 berechnet hatten, erhielten wir ein Gewichtsmittel von $M_w = 12,91 \cdot 10^6$ und ein Zahlenmittel von $M_n = 5,66 \cdot 10^6$. Für eine durch Ultraschall abgebaute native DNS, für die $[\eta] = 9$ war und $S = 10,21$, errechneten wir für $M_{S\eta} = 1,214 \cdot 10^6$. Das Gewichtsmittel betrug $M_w = 1,282 \cdot 10^6$, das Zahlenmittel $M_n = 0,820 \cdot 10^6$.

Aus der mittleren Kettenlänge der Kontrolle, die dem Zahlenmittel M_n entspricht, und der mittleren Kettenlänge der abgebauten nativen Probe (M_n) läßt sich die Zahl der Brüche berechnen.

$$\frac{M_{n_0}}{M_n} - 1 = \text{Zahl der Doppelbrüche}$$

Aus dem angeführten Beispiel ergab sich:

$$\frac{5,66 \cdot 10^6}{0,820 \cdot 10^6} - 1 = 5,9, \text{ d.h.}$$

das mittlere Molekulargewicht war auf etwa 1/7 des Ausgangsgewichtes degradiert worden.

Um die Zahl der Einzelbrüche pro Nukleotidstrang ermitteln zu können, mußten wir die DNS vor der Molekulargewichtsbestimmung denaturieren. Die Vollständige Trennung der beiden Nukleotidketten war durch die Behandlung mit 2 %igem Formaldehyd gewährleistet. Aus dem Verhältnis der mittleren Kettenlänge nativer DNS zur mittleren Kettenlänge

denaturierter DNS ergab sich die Zahl der Einzelbrüche wie folgt:

$$\frac{M_n \text{ (nativ)}}{2 \cdot M_n \text{ (denat.)}} - 1 = \text{Zahl der Einzelbrüche.}$$

(Beispiele in Tab. 4).

5. Schmelzpunktbestimmungen

Bei allmählicher Erwärmung einer DNS-Lösung trennen sich die beiden Einzelstränge des Doppelmoleküls voneinander, wobei die sie verbindenden Wasserstoffbrücken aufbrechen. Dies äußert sich in einer Absorptionserhöhung bei 260 nm. Die Temperatur, bei der 50 % der maximal möglichen Absorptionserhöhung erreicht ist, wird als Schmelzpunkt bezeichnet. Der Schmelzpunkt ist somit ein Maß für die Stabilität der Wasserstoffbrücken.

Die Schmelzpunktbestimmungen wurden in einer kontinuierlich heizbaren Quarzküvette im Spektralphotometer (Zeiss) durchgeführt, wobei die Absorption während des Erhitzens von einem Schreiber registriert wird. Durch Ausmessen der Kurven konnte der Schmelzpunkt T_m ermittelt werden. Die maximale Absorptionserhöhung, die bei 90 °C erreicht war, betrug 40 %.

Ein empfindliches Kriterium für die Stabilität der Wasserstoffbrücken war die Renaturierung, worunter man das Zusammenlagern der getrennten Einzelketten unter Wiederausbildung von Wasserstoffbrücken beim langsamen Abkühlen einer DNS-Lösung versteht. Diesen Prozess verfolgten wir durch die Absorptionsabnahme während des Abkühlens von 90 ° auf 25 °C. Die meisten unsererer DNS-Präparationen waren nach dem Schmelzen nur zu 60 % renaturierbar.

Der Schmelzpunkt nativer Thymus-DNS betrug in 0,01 M NaCl-Lösung 66 °C, in 0,2 M NaCl 86 °C. Die höhere Ionenkonzentration wirkt sich stabilisierend auf die Wasserstoffbrücken gegenüber thermischer Denaturierung aus.

IV. Physikalische und chemische Untersuchungsmethoden

1. Bestrahlung mit ^{60}Co - γ -Strahlen

Proben von 3 ml DNS-Lösung in Konzentrationen von 0,5, 5,0 und 10 mg/ml wurden in 0,01 M NaCl, einige in 0,4 M NaCl-Lösungen mit Stickstoff angereichert und bestrahlt. Bei verdünnten Lösungen ließen wir 5 min lang einen Stickstoffstrom durch die Probe perlen, bei DNS-Gelen wurde mit einer Vakuumpumpe die in der Probe vorhandene Luft 3 bis 5 mal abgesaugt und mittels eines Zweiwegehahns Stickstoff eingeleitet. Die Bestrahlung geschah in Kobalt- $^{60}\gamma$ -Quellen (Atomic Energy of Canada Ltd.). Die Dosisleistung der beiden benutzten Quellen am Ort der Probe entsprach für "Gammacell 200" $6,5 \cdot 10^4$ R/h und für "Gammacell 220" $1,7 \cdot 10^6$ R/h.

2. Bestrahlung mit ultraviolettem Licht

Proben von je 5 ml DNS-Lösung der Konzentration 0,2 mg/ml in 0,01 M NaCl wurden in einem rotierenden Quarzrohr mit UV-Licht der Wellenlänge 253,7 nm bestrahlt (Quecksilber-Niederdruckbrenner "Vykor" der Fa. Gränzel, Karlsruhe). Die in der Probe absorbierte Energie betrug nach der von uns durchgeführten Aktinometrie mit Uranyloxalat gemäß der Vorschrift von BOWEN (1949) $276 \cdot 10^4$ erg \cdot min $^{-1}$ \cdot ml $^{-1}$. Dieser Wert konnte bei gleichen Versuchsbedingungen mit einer "biologischen" Dosimetrie (Inaktivierung von Phagen) bestätigt werden. Unter Verwendung der Daten von TESSMAN (1956) sowie SETLOW und BOYCE (1963) für den Phagen T4, dessen Inaktivierungsdosis durch physikalische Absolutmessungen bestimmt wurde, ermittelten wir die in einer Suspension aus Thymus-DNS und MS 2 Phagen absorbierte Energiemenge (HOTZ 1966).

3. Degradierung mit Ultraschall

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Strahleneffektes vom Molekulargewicht degradierten wir die DNS mit Hilfe eines Branson-Ultraschall-Desintegrators "Sonifier" mit der Frequenz von 20 kHz. Wir benutzten für unsere Proben

von 3 ml DNS-Lösung mit der Konzentration 0,5 mg/ml die Mikrospritze und beschallten 5 bis 10 sec bei der Amplitude 1.

Dabei wurde das Molekulargewicht auf $1/4$ bis $1/5$ reduziert. Sedimentationsanalysen zeigten, daß bei der Schalldegradierung vorwiegend Doppelbrüche im DNS-Molekül induziert werden.

4. Enzymatische Degradierung

Eine kontrollierbare Degradierung, bei der im Gegensatz zur Ultraschall-Degradierung zunächst nur Einzelbrüche erzeugt werden (THOMAS 1956), bietet der Abbau mit Desoxyribonuklease. Wir führten die Abbauprobe mit kristalliner Pankreas-Desoxyribonuklease I (Worthington) bei pH 7 in 0,01 M NaCl unter Zusatz von $0,5 \cdot 10^{-4}$ M $MgCl_2$ + $0,5 \cdot 10^{-4}$ M $MnCl_2$ durch, wobei wir 0,1 µg Enzym/ml DNS einsetzten. Die Reaktion wurde in einem Drehviskosimeter verfolgt und bei der gewünschten Degradierung durch Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 1 M und durch Rühren mit gleichen Teilen 75 %igem Phenol unterbrochen.

5. Depurinisierung

Inkubiert man eine DNS-Lösung 12 Std. bei 81 °C, so erleidet die DNS einen Verlust von 0,9 % Adenin und 1,4 % Guanin. Nach 21 Std. bei derselben Temperatur beträgt der Verlust an Adenin 1,2 % und an Guanin 2,5 % (GREER und ZAMENHOF 1959). Im Mittel bedeutet dies einen Verlust von 0,184 % an Purinbasen pro Stunde. Mit einem Q_{10} von 3 berechneten wir nach den Daten der genannten Autoren für 72 °C eine Depurinisierungsrate von $0,63 \cdot 10^{-4}$ Basen pro Stunde. In 5 Std. waren dann $31,5 \cdot 10^{-4} = 0,315$ % Purinbasen verlorengegangen.

Wir inkubierten DNS-Lösungen in 0,2 M NaCl 5 Std. lang bei 72 °C, was nach obiger Rechnung den Verlust von 3,15 Purinbasen aus 1000 Nukleotiden zur Folge hat.

Vor und nach der Inkubation wurde die Viskosität der Lösungen gemessen, um eine eventuell eingetretene Degradierung festzustellen.

6. Adsorptionschromatographie

Die Säulenchromatographie von Nukleinsäuren an methyliertem Albumin wurde 1955 von LERMAN eingeführt. Diese Methode der Fraktionierung von RNS und DNS nach dem Molekulargewicht beruht auf der großen Affinität der sauren Phosphatgruppen der Nukleinsäuren zu basischem Protein. Die Bindung kann durch NaCl-Lösungen ansteigender Konzentration wieder gelöst werden. MANDELL und HERSHEY (1960) verwenden für die Säulenfüllung pulverisiertes Kieselgur, an welches das methylierte Albumin adsorbiert ist. Diese sog. MAK-Säulen dienten SUEOKA und CHENG (1961) zur Auftrennung der DNS nach dem Basenverhältnis. Die Autoren stellten fest, daß sich eine DNS mit hohem Cytosin-Guanin-Gehalt bei niedrigerer NaCl-Konzentration eluieren ließ als solche mit geringem C-G-Gehalt.

Besonders empfindlich und spezifisch erwies sich diese Methode für die Trennung von nativer und denaturierter DNS (HERSHEY u.a. 1963). Die von uns verwendeten Säulen entsprachen der Vorschrift von HAYASHI u.a. (1965).

a) Methylierung des Albumins

2 g Rinderserumalbumin (Behringwerke) wurden in 200 ml Methanol + 1,68 ml 12 N HCl gelöst und 5 Tage bei 37 °C in der Dunkelheit aufbewahrt und regelmäßig geschüttelt, so daß sich ein gleichmäßig flockiger Niederschlag bilden konnte. Bei dieser Behandlung werden nach FRAENKEL (1945) alle Carboxylgruppen des Proteins verestert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und 3 bis 4 mal mit Methanol gewaschen, bis die Säure beseitigt war. Danach wurde das Sediment 2 mal mit Äther gewaschen und über KOH im Vakuumexsikkator getrocknet. Für den weiteren Gebrauch wurde eine 1 %ige wässrige Lösung mit der pH 6,7 hergestellt und in Portionen eingefroren.

b) Herstellung der Kieselgur-Protein-Suspension

Das Kieselgurpulver (Hyflo Supercel Serva) wurde nacheinander mit 1 N HCl und 0,5 N NaOH gereinigt, mit Wasser gewaschen und in 2 M NaCl gekocht, erneut mit Wasser und

mit 0,4 M NaCl + 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,7 gespült, auf einem Büchner-Trichter abgesaugt und bei 100 °C getrocknet. Eine Probe wurde im Reagenzglas mit 0,1 M NaCl-Lösung aufgeköcht, abzentrifugiert und der Überstand auf UV-Absorption geprüft.

20 g des gereinigten Kieselgurs wurden mit 100 ml 0,1 M NaCl + 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,7 aufgeköcht und in eine Vakuumflasche gefüllt. Unter Rühren über dem Magnetrührer wurde die Luft aus der Suspension evakuiert. Nach Abkühlen wurden 5 ml der 1 %igen Albuminlösung zupipetiert. Unter Vakuum mußte noch 5 min weiter gerührt werden. Auf einem Büchner-Trichter wurde die Suspension mit 100 ml der gepufferten 0,1 M NaCl-Lösung gespült und das Sediment schließlich in 100 ml derselben Lösung aufgenommen. Diese MAK-Suspension mußte bis zum Verbrauch im Kühlschrank aufbewahrt werden; sie ist in der Regel nicht länger als 10 Tage haltbar.

c) Bereitung der Säulenfüllung

Wir verwendeten doppelwandige, frittierte Glassäulen von 2 cm Durchmesser. Die ersten Versuche wurden bei 37 °C thermostatisiert durchgeführt, jedoch zeigten die Ergebnisse bei Raumtemperatur keine Unterschiede. Die etwa 4 cm hohe Säulenfüllung, die für jeden Versuch neu bereitet werden mußte, war ausreichend für 1 mg DNS. Sie bestand aus folgenden Schichten:

1. 0,8 g gereinigte Cellulose
2. 2,0 g gereinigtes Kieselgur + 0,5 ml
1 %ige Albuminlösung
3. 1,5 g gereinigtes Kieselgur + 5 ml
MAK-Suspension
4. 0,5 g gereinigtes Kieselgur

Gefüllt und gespült wurde die Säule mit 0,4 M NaCl + 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,7.

d) Beschickung der Säule und Elution

1 mg DNS wurde in 0,4 M NaCl auf die Säule gegeben und mit derselben Lösung nachgespült. Mit einem linearen Gradienten (je 170 bis 250 ml einer 0,6 M bzw. 1,0 M NaCl-Lösung) wurden zwei Säulen gleichzeitig eluiert. Die Elutionslösungen waren alle mit 0,05 M Na_2HPO_4 + 0,05 M KH_2PO_4 pH 6,7 gepuffert.

Das Eluat wurde im Uvicord (LKB) bei 260 nm gemessen und die Absorption von einem Punktschreiber registriert; Fraktionen von 5 bis 10 ml wurden aufgefangen. In 0,4 M NaCl eluierte von der Phenol-DNS eine Vorfraktion, deren Anteil an der aufgetragenen DNS-Menge auch nach γ -Bestrahlung, Schalldegradierung und Denaturierung nahezu unverändert blieb. Diese Vorfraktion ist in den Auswertungen der Versuche nicht berücksichtigt; sie wurde gesammelt und einer besonderen chemischen Analyse unterworfen. Die Hauptfraktion eluierte in höherer Salzkonzentration; sie bestand aus etwa 4 bis 6 Einzelfraktionen, welche vereinigt wurden. Aus der bei 260 nm gemessenen Extinktion bestimmten wir die Menge eluierter DNS in % der aufgetragenen DNS-Menge.

Bei den relativ niedrigen Strahlendosen unserer Untersuchungen war noch keine Veränderung der DNS-Absorption bei 260 nm zu messen.

V. Durchführung und Auswertung der Versuche

Jede DNS-Präparation ergab eine Versuchsserie. Da in Vorversuchen festgestellt wurde, daß die Zeitspanne zwischen Bestrahlung und Analyse keinen Einfluß auf das Ergebnis hatte, bestrahlten wir immer mehrere Proben gleichzeitig und chromatographierten sie nacheinander. Zu Beginn und am Ende einer jeden Serie wurde die unbestrahlte Kontroll-DNS chromatographiert, deren mittlere Ausbeute für die dosisabhängigen Darstellungen gleich 100 % gesetzt wurde. Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert aus mindestens zwei Bestimmungen in einer Serie dar. Alle erhaltenen Dosis-effektkurven folgen Exponentialgleichungen der Beziehung

$$\frac{N}{N_0} = e^{-\alpha D}$$

Dabei gibt N_0 die Zahl der bestrahlten DNS-Moleküle an, N ist die Zahl der durch die Bestrahlung nicht geschädigten Moleküle, die unter bestimmten Bedingungen von der Säule eluiert werden (vgl. C. II.). Im halblogarithmischen Raster ergeben sich Geraden mit der Steigung α , wenn man auf der Ordinate $\frac{N}{N_0}$ und auf der Abszisse die Strahlendosis D aufträgt. Bei exponentiellen Dosiseffektcurven ist es üblich, diejenige Dosis anzugeben, bei der im Mittel alle bestrahlten Einheiten einmal getroffen sind. Dies ist die Dosis, bei der $\alpha D = 1$ ist, d.h.

$$\frac{N}{N_0} = e^{-1} = 0,37$$

Diese Dosis wird als D_{37} bezeichnet und gibt in unserem speziellen Fall den Wert an, bei dem die Elution bestrahlter DNS von der MAK-Säule 37 % der Elution einer Kontroll-DNS betrug. Die Dosiseffektcurven wurden im halblogarithmischen Maßstab dargestellt und die D_{37} der verschiedenen Kurven miteinander verglichen.

C. Ergebnisse

I. Fraktionierung von DNS

Die Auftrennung von Kalbsthymus-DNS nach dem Molekulargewicht mit Hilfe der MAK-Säule wurde von HAGEN (1967) durch stufenweise Elution mit ansteigenden NaCl-Konzentrationen in Phosphatpuffer durchgeführt. Die Sedimentationsverteilung der Fraktionen ergab, daß 40,6 % der Gesamtmenge bei 0,66 M NaCl eluiert wird. Der größte Anteil dieser Fraktion entsprach einem S-Wert von 20, d.h. einem Molekulargewicht von $9 \cdot 10^6$. Im Unterschied zu diesen Versuchen benutzten wir einen linear ansteigenden NaCl-Gradienten, bei dem die Gesamtelution geringer war als bei einem Stufengradienten; die Hauptmenge der DNS eluierte jedoch bei höherer Salzkonzentration (etwa in 0,75 M). Die mittlere Fraktion (höchste Absorption) sedimentierte mit einem S-Wert von 26 bis 28. Nach MANDELL und HERSHEY (1960) vermindert sich die Gesamtelution auch,

wenn man die DNS in einer zu niedrigen Ionenkonzentration auf die Säule aufträgt. Diese Erfahrung konnten wir mit der hochmolekularen T1-Phagen-DNS, die erst in 0,8 bis 0,9 M NaCl eluierte, in zwei Fraktionierungsversuchen bestätigen.

Mit der ohne Fällung isolierten "Phenol-DNS" erhielten wir folgendes Elutionsprofil.

Abb. 2

Von 1 mg aufgetragener DNS wurden 4 bis 8 % UV-absorbierender Substanz in 0,4 M NaCl nicht an die Säule angelagert, sondern sofort wieder eluiert. Bei dieser Vorfraktion handelte es sich um teilweise dialysierbare niedermolekulare Bestandteile. Für die weiteren Untersuchungen wurde dieses Eluat im Rotationsverdampfer eingeengt und über Sephadex G 25 mit 0,05 M Ammoniumacetat entsalzt oder gegen 0,01 M NaCl dialysiert. Die Rechromatographie ergab 77,2 % Elution in 0,4 M und 4,6 % bei höherer Salzkonzentration. Die chemische Analyse der Vorfraktion von 5 DNS-Präparaten zeigte einen großen Anteil (50 - 70 %) an RNS und einen kleineren - in der Menge sehr variablen - Anteil an DNS, jedoch kein Protein.

Die Hauptfraktion der "Phenol-DNS" eluierte in 0,75 - 0,85 M NaCl. Bei guten Präparationen enthielt diese Fraktion 60 - 80 %, bei schlechten Präparationen 50 % oder weniger der aufgetragenen DNS-Menge. Degradierete DNS eluierte in 0,6 - 0,7 M NaCl und zeigte eine bessere Ausbeute als unbehandelte (vgl. Tab. 1). Bei der Rechromatographie unbehandelter nativer DNS konnten 80 % als Hauptfraktion wieder eluiert werden. Daß dieser Wert nicht höher war, liegt vermutlich daran, daß das Eluat im Rotationsverdampfer eingeengt werden und durch Dialyse auf die gewünschte Ionenkonzentration gebracht werden mußte, d.h. Arbeitsprozessen ausgesetzt war, bei denen Scherkräfte auf die DNS einwirken. Nach HERSHEY u.a. (1963) verändern Scherkräfte die DNS derart, daß sie eine feste Bindung an die MAK-Säule erfährt. Thermisch denaturierte

Tabelle 1: Fraktionierung einiger DNS-Präparationen aus Kalbsthymus an Säulen aus methyliertem Albumin auf Kieselgur.

DNS Präp. Nr.	Viskosität [η]	Elution in % der aufgetragenen Menge	
		Verfraktion	Hauptfraktion
<u>Nativ, unbehandelt</u>			
11	140	8,4	71,6
15	-	4,5	58,0
18	130	8,8	82,0
21	120	-	66,0
25	40	-	80,0
30	110	4,8	57,0
31	110	10,7	57,0
40	170	7,8	62,5
<u>Nativ, mit Ultraschall degradiert</u>			
15	21	5,7	78,0
21	11	3,6	93,0
31	-	11,3	74,5
Dup.	-	-	86,0
<u>Denaturiert, 10 min 90 °C mit nachfolgendem raschen Abkühlen</u>			
18	-	8,8	-
40	18	11,9	-
Dup.	29	-	-

Der Proteingehalt der Präparationen betrug 2 - 3 %, der RNS-Gehalt 4 - 8 %.

Tabelle 2: Bindung bestrahlter DNS an die MAK-Säule.
 (Konzentration: 0,5 mg/ml 0,01 M NaCl).
 Angaben in % gebundener zu aufgetragener
 DNS-Menge.

DNS Präp.	Kontrolle unbe- strahlt	⁶⁰ Co-γ-Strahlen					
		250 R	500 R	750 R	1000 R	1500 R	2000 R
11	28,4	63,0 (300R)	82,0 (600R)				
12	25,0				91,2		
18	18,0	55,5	68,6	89,4			
29	50,0	70,0	81,0	79,4	88,4	82,7	
30	43,0					76,9	79,5
31	43,0					84,1	86,8
33	36,4		82,6				
Dup.	20,2	56,0	64,8				
Dup.	37,5	68,0	70,5	79,7	78,3	74,0	80,2
Dup.	52,0		76,7		82,0		

(10 min 90 °C), mit NaOH denaturierte (nach STUDIER 1965) oder in 0,2 M NaCl mit 2 % Formaldehyd denaturierte (nach DAVISON u.a. 1964) DNS-Proben konnten unter unseren Versuchsbedingungen nicht von der Säule eluiert werden. Eine Übersicht über die genannten Elutionsverhalten gibt Tabelle 1.

II. Bindung bestrahlter DNS an die MAK-Säule

1. Bestrahlung nativer DNS

Wir prüften den Einfluß ionisierender Strahlen auf die Fraktionierbarkeit der DNS und stellten fest, daß bestrahlte DNS auf der Säule zurückgehalten wird, und zwar in einem exponentiellen Verhältnis zur Strahlendosis. Tabelle 2 und Abbildung 3 geben die Ergebnisse von 6 bzw. 10 DNS-Präparationen wieder. Alle Meßpunkte sind Mittelwerte aus mindestens 2 Fraktionierungen.

Abb. 3

Im halblogarithmischen Koordinatensystem ergibt sich - setzt man den Wert unbestrahlter Kontroll-DNS gleich 100 % - mit steigender Dosis eine geradlinige Abnahme der Elution.

Abb. 4

Aus dem Verlauf der Kurve ist zu entnehmen, daß es nur ein bestimmtes Ereignis pro Molekül ist, das die Bindung an die MAK-Säule verursacht. Die D_{37} für dieses Ereignis beträgt bei einer DNS-Konzentration von 0,5 mg/ml in 0,01 M NaCl 460 R. Dies bedeutet, daß 460 R ausreichen, um im Mittel in jedem der DNS-Moleküle in der Lösung ein solches Ereignis hervorzurufen. Dieser Wert ist im Bereich von 0° bis 20°C von der Temperatur während der Bestrahlung unabhängig. Jedoch ist der Wert in starkem Maße von der Ionenkonzentration der DNS-Lösung abhängig. In 0,4 NaCl ist die DNS um einen Faktor von 2,5 strahlenresistenter als in 0,01 M NaCl.

2. Bestrahlung degradiertes DNS

Untersucht man die Abhängigkeit des Strahleneffektes von der Kettenlänge der DNS, so stellt man fest, daß bei kurzen Molekülen eine im Vergleich zu langen Molekülen weitaus höhere Dosis benötigt wird, um das für die Bindung an die MAK-Säule verantwortliche Ereignis hervorzurufen. Wir degradierten die native DNS mit Ultraschall. Aufgrund der Viskosität berechneten wir, daß diese Behandlung das Molekulargewicht auf ein Viertel bis ein Fünftel herabsetzt. Das Molekulargewicht unbehandelter DNS betrug $1 - 1,2 \cdot 10^7$ ($[\eta] \approx 110$), das der degradierten DNS $2 - 3 \cdot 10^6$ ($[\eta] \approx 30$). Die Elution solcher degradierten Proben von der MAK-Säule war, wie Tabelle 1 zeigt, wesentlich erhöht.

Abb. 5

Die Abnahme der Elution verläuft, wie man es aus Abb. 5 ersehen kann, sehr viel flacher als bei undegradiertem DNS. Im halblogarithmischen Maßstab zeigt sich auch hier eine lineare Dosiswirkungskurve. Von einem bestimmten Dosiswert an (zwischen 15 und 20 R) scheint die Elutionsabnahme abgeschwächt zu sein. Berücksichtigt man nur die Anfangsneigung der Kurve, so erhält man für den D_{37} -Wert die Dosis 11,2 kR. Dieser Wert ist 20 mal höher als die D_{37} undegradierten DNS (vgl. Abb. 4).

3. Degradierung bestrahlter DNS

Nach der Degradierung bestrahlter DNS-Proben konnten wir eine Erhöhung der Elutionsrate gegenüber undegradiertem DNS messen. Aus der Darstellung in Abb. 6 entnimmt man eine

Abb. 6

D_{37} von 1880 R. Dies entspricht dem 4-fachen Wert der D_{37} unbehandelten DNS. Ein Vergleich dieser beiden Dosis-effektcurven läßt darauf schließen, daß das strahlengeschädigte Kettenmolekül durch die mechanische Degradierung in Abschnitte zerlegt wurde, von denen nur die ungeschä-

digten die Säule passieren. Offenbar ist der für die Bindung an die MAK-Säule verantwortliche Strahlenschaden im DNS-Molekül lokal begrenzt.

4. Bestrahlung von DNS als Gel

Mit der Bestrahlung von DNS in hohen Konzentrationen sollte untersucht werden, inwieweit intermolekulare Vernetzungen dafür verantwortlich gemacht werden könnten, daß die bestrahlte DNS an methyliertes Albumin gebunden wird. Vernetzungen treten bevorzugt an langen geknäuelten Molekülen auf und würden in dieser Beziehung dem von uns festgestellten Strahlenschaden entsprechen. DAS GUPTA (1966) zeigte elektronenmikroskopisch, daß Vernetzungen auch bei Bestrahlung verdünnter Lösungen und bevorzugt in niedrigen Ionenkonzentrationen auftreten. In hochkonzentrierten DNS-Gelen sowie in trockener DNS unter Stickstoffatmosphäre dagegen sind Vernetzungen relativ häufiger (ALEXANDER und LETT 1960, HAGEN und WELLSTEIN 1965).

Wir bestrahlten gelartige DNS-Lösungen von 5 mg/ml und 10 mg/ml. Die Dosiseffektcurven (Abb. 7) ergeben D_{37} -Werte

Abb. 7

von 11,5 kR und 50 kR. Diese sind um das 2,5-fache bzw. 5-fache höher, als man aus einer linearen Beziehung zwischen Strahlendosis und Konzentration zu erwarten hätte. Da in dem Bereich zwischen 0,2 mg und 2 mg DNS/ml eine solche lineare Beziehung in bezug auf die Abnahme der Viskosität besteht, nehmen wir an, daß dies auch für unseren Strahlenschaden gilt. Die Elutionsrate zeigte, daß der gesuchte Strahlenschaden in DNS-Gelen nicht begünstigt ist, d.h. die bestehende Konzentrationsabhängigkeit läßt nicht auf Vernetzungen schließen.

Die beiden Dosiseffektcurven zeigen zunächst ein Minimum, dann aber mit steigender Dosis einen Wiederanstieg, dessen Steigung zwar geringer ist, jedoch bei 100 bzw. 300 kR zu einer Elution von 100 % der Kontrolle führt. Bei mecha-

nischer Degradierung der Proben im Elutionsminimum erreichten wir 50 % Elutionserhöhung, nach einer Dosis von 200 kR konnten wir mit der Degradierung die Elution nur um 8 % erhöhen. Dies zeigt, daß dem Wiederanstieg der Kurven eine strahlenbedingte Degradierung der DNS zugrunde liegt.

5. Bestrahlung mit ultraviolettem Licht

Es ist bekannt, daß für die hohe Absorption der DNS bei 260 nm die Basen verantwortlich sind. Sie sind es auch, die bei Bestrahlung mit Licht dieser Wellenlänge in erster Linie verändert und geschädigt werden (MARMUR u.a. 1961). Zum Vergleich mit der Wirkung von γ -Strahlen bestrahlten wir DNS-Lösungen von 0,2 mg/ml mit UV-Licht der Wellenlänge 253,7 nm. Die Fraktionierung dieser Proben an der MAK-Säule ergab die in Abb. 8 dargestellte Elutionsabnahme mit zunehmender Belichtungszeit.

Abb. 8

Die D_{37} ist hierbei nach 3,3 min erreicht, was einer Energieaufnahme von $9,2 \cdot 10^6$ erg/ml entspricht.

Der Prozentanteil geschädigter Basen nach UV-Bestrahlung läßt sich aus der Abnahme der Absorption errechnen. Man benutzt hierzu zweckmäßigerweise denaturierte DNS, da bei nativer DNS der hyperchrome Effekt die Absorptionsabnahme überlagern würde. Die folgenden Messungen geben uns einen ungefähren Wert für den Anteil zerstörter Basen.

	UV-Licht	$E_{260}^{1,0}$	E %	% Zerstörte Basen
Native DNS	0	0,825		0
Denat. DNS	0	1,00	100	0
	1 min	1,00	100	0
	2 min	0,99	99	1
	3 min	0,97	97	3
	4 min	0,96	96	4
	5 min	0,95	95	5

Nach diesen Messungen waren unter unseren Versuchsbedingungen nach einer Energieaufnahme von $9,2 \cdot 10^6$ erg/ml 3,3 % aller Basen in der DNS verändert.

6. Depurinisierung

Zu einer weiteren Untersuchung auf Basenschädigungen inkubierten wir - unter Verwendung der Daten von GREER und ZAMENHOF (1959) - eine DNS-Lösung in 0,2 M NaCl 5 Std. lang bei 72 °C oder 15 Stunden bei 62 °C. Dabei sollen 3,15 Purinbasen aus 1000 Nukleotiden herausgelöst werden, d.h. 0,157 % aller Basen. Viskositätsmessungen vor und nach der Inkubation zeigten keine Veränderung, so daß wir annehmen können, daß keine Degradierung eingetreten war. Die Elution von der MAK-Säule betrug im Mittel 65 % der Kontrolle.

7. Gegenüberstellung der Ergebnisse aus C. II. 1., 5. und 6.

Ein Vergleich des Wertes der Depurinisierung mit den Ergebnissen der UV-Bestrahlung und der γ -Bestrahlung erfolgt in Tabelle 3.

Tabelle 3: Veränderung von Basen in der DNS bei 37 % Elution von der MAK-Säule.

Methode	% Basen verändert	Bestimmungsart	Autor
^{60}Co - γ -Strahlen	0,03	G-Wert für Basen	WEISS (1964)
UV-Licht, 253,7 nm	3,3	Absorptionsabnahme denaturierter DNS	eigene Messungen
Depurinisierung	>0,157	Verlust an Adenin u. Guanin	GREER und ZAMENHOF (1959)

Nach WEISS (1964) kann man für die Gesamtheit der Basen in der DNS einen G-Wert von 1 annehmen und aus diesem Wert berechnen, wieviele Basen bei einer Dosis von 460 R zerstört

werden. Das mittlere Molekulargewicht eines Desoxyribonukleotids beträgt in Kalbsthymus-DNS mit 40 % CG-Gehalt 308. Eine DNS-Lösung von 0,5 mg/ml enthält somit $1,6 \mu$ mol Nukleotide pro ml oder

$$1,6 \cdot 6 \cdot 10^{23} \cdot 10^{-6} = 9,6 \cdot 10^{17} \text{ Nukleotide/ml.}$$

460 R führen zu $2,82 \cdot 10^{14} \cdot 100$ eV Energieabsorption. Ist $G = 1$, dann sind nach dieser Dosis $2,82 \cdot 10^{14}$ Basen zerstört. Bezogen auf $9,6 \cdot 10^{17}$ Nukleotide sind dann

$$\frac{2,82 \cdot 10^{14}}{9,6 \cdot 10^{17}} = 2,95 \cdot 10^{-4} = 0,0295 \%$$

der Basen zerstört. Vergleicht man diesen Wert mit dem Anteil geschädigter Basen durch UV-Bestrahlung oder durch Depurinisierung (vgl. Tabelle 3), so ergeben sich bei gleicher Abnahme der Elution verschiedene Werte für die Basenzerstörung.

III. Schmelzpunktbestimmungen

Die Absorptionserhöhung der DNS bei 260 nm mit steigender Temperatur beruht darauf, daß die hydrophoben Kräfte zwischen den beiden Einzelsträngen der Doppelhelix geschwächt werden und die Wasserstoffbrücken aufreißen. Dies geht nicht nach dem "Reißverschluß-Mechanismus" vor sich, sondern sukzessive von bestimmten empfindlichen Zonen im Molekül aus in beiden Richtungen (INMAN 1966). Es ist bekannt, daß ionisierende Strahlen einen starken Einfluß auf die Stabilität der Wasserstoffbrücken haben; nach Bestrahlung erfolgt die Denaturierung schon bei tieferen Temperaturen, d.h. es besteht eine Erniedrigung des Schmelzpunktes (HAGEN und WILD 1964). Wir untersuchten die Anhängigkeit der Schmelzpunktverschiebung von der Kettenlänge der DNS, da der Verdacht bestand, daß der Effekt an der MAK-Säule, der ja eine starke Abhängigkeit von der Kettenlänge zeigte (vgl. Abb. 5), durch denaturierte Zonen hervorgerufen würde.

Bei nativer, undegradierter DNS ist nach Bestrahlung mit 50 kR eine Schmelzpunkterniedrigung von 15 °C zu messen. Ultraschalldegradierte DNS zeigt bei 4 kR und 10 kR keinen Unterschied zur Kontrolle, bei 50 kR eine Verschiebung um 5,6 °C, wie aus Abb. 9 ersichtlicht ist.

Abb. 9

Diese Tatsache läßt darauf schließen, daß die Wasserstoffbrücken in kurzen DNS-Ketten stabiler sind als in langen. Da die Renaturierung allgemein als ein empfindlicheres Kriterium für die Wasserstoffbrückenzerstörung angesehen wird, bestimmten wir Renaturierungskurven (Abb. 9) von undegradierter und degradiertter DNS, indem wir die Extinktionsabnahme bei langsamem, kontinuierlichem Abkühlen der Probe im Spektralphotometer verfolgten. Hierbei zeigte sich jedoch kein meßbarer Unterschied zwischen den beiden DNS-Proben.

Diese Versuche wurden nicht weitergeführt, da zu hohe Strahlendosen notwendig waren, um einen meßbaren Effekt zu erhalten, der somit zur Aufklärung des diskutierten Strahlenschadens nur wenig beitragen konnte.

IV. Enzymatische Degradierung

Aus den Untersuchungen von THOMAS (1956) und von BERNARDI und SADRON (1964) zur Wirkungsweise von pankreatischer Desoxyribonuklease auf DNS ist zu entnehmen, daß durch die Spaltung einer Phosphoresterbindung zunächst nur ein Bruch in der Einzelkette entsteht. Zu einem Bruch der Doppelkette kommt es erst dann, wenn die Einzelbrüche so häufig sind, daß zufällig ein zweiter Bruch an der gegenüberliegenden oder benachbarten Stelle eintritt und die dazwischenliegenden Wasserstoffbrücken aufspringen. Enzymatisch degradierte DNS-Moleküle besitzen deshalb noch zahlreiche Einzelbrüche in ihren Ketten im Gegensatz zu Molekülen, die mit Ultraschall abgebaut wurden.

Mit einer derart degradierten Probe wollten wir prüfen, ob Einzelbrüche die Ursache für die Bindung bestrahlter DNS an die MAK-Säule sei, da es bekannt ist, daß auch ionisierende Strahlen Einzelbrüche in der DNS auslösen. Wie wir zeigen konnten, reicht ja schon ein einziges Ereignis pro Molekül aus, um dasselbe an die Säule zu binden; enzymatisch degradierte DNS müßte daher in starkem Maße an die Säule gebunden werden.

Zur Bestimmung der Zahl der Einzelbrüche wurde die DNS in 2 %igem Formaldehyd denaturiert, und mit Hilfe der Sedimentationsanalyse die Verteilung der Molekulargewichte der getrennten Einzelfragmente bestimmt. In Tabelle 4 sind Versuchsergebnisse zur Charakterisierung enzymatisch degradierter DNS im Vergleich zu Ultraschall degradierter DNS und nativer DNS zusammengestellt.

Die Elutionsrate der betreffenden Proben von der MAK-Säule zeigt, daß kurze Ketten besser eluiert werden als lange, unabhängig von der Zahl der Einzelbrüche im Einzelstrang. Vergleicht man z.B. die Probe D₈ mit D₇, so zeigt die enzymatisch degradierte Probe drei Einzelbrüche pro Molekül, die mechanisch degradierte keine Einzelbrüche; die Elution von der MAK-Säule ist bei den beiden Proben etwa gleich. Die Einzelbrüche allein können also nicht die Ursache für die Bindung an die Säule sein.

Eine weitere Untersuchung zur Frage, welche Rolle die Einzelbrüche bei der Bindung bestrahlter DNS an die MAK-Säule spielen, wurde mit der Molekulargewichtsbestimmung einer mit 550 R bestrahlten Probe vor und nach der Fraktionierung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 angeführt. Da die Anzahl von Einzelbrüchen vor der Fraktionierung sowie im Eluat von bestrahlter DNS die gleiche ist, erscheint es als sicher, daß die Trennung der Moleküle auf der MAK-Säule nicht nach der Anzahl der Einzelbrüche erfolgt.

Tabelle 4: Molekulargewichte degradiertes DNS, die Bestimmung von Einzelbrüchen und die Elution von der MAK-Säule.

Probe	Art der Behandlung	nativ			denaturiert			Zahl der Einzelbrüche	Elution von der MAK-Säule in %
		S_{app}	$M_w \cdot 10^{-6}$	$M_n \cdot 10^{-6}$	S_{app}	$M_w \cdot 10^{-6}$	$M_n \cdot 10^{-6}$		
Kontrolle	unbehandelt	20,3	12,91	5,66	17,3	4,98	2,34	0 ± 0,2	65,5
D ₄	DNase	10,32	2,06	1,08	5,47	0,27	0,18	2,00	62,5
D ₅	"	16,65	7,15	2,71	8,28	1,11	0,60	1,26	72,0
D ₈	"	14,21	4,31	1,93	6,95	0,44	0,24	3,02	84,0
D ₂₃	"	25,20	11,61	8,30	15,80	3,11	2,31	0,80	55,0
D ₂₅	"	23,42	8,98	7,53	15,97	3,88	1,87	1,01	38,4
D ₂₆	"	20,10	8,84	6,05	10,80	1,31	0,87	2,47	47,3
D ₁	Ultraschall 10 sec	9,32	0,88	0,62	6,92	0,63	0,29	0 ± 0,07	} 86,0-93,0
D ₂	" 10 sec	10,21	1,28	0,82	7,86	1,05	0,58	0 ± 0,29	
D ₇	" 10 sec	10,30	1,38	0,98	9,10	0,97	0,54	0 ± 0,09	
D ₁₈	" 2 sec	13,15	2,00	1,48	11,13	1,23	0,82	0 ± 0,10	
D ₂₀	" 6 sec	10,60	1,22	0,96	8,50	0,75	0,46	0 ± 0,03	
D ₂₁	" 8 sec	9,34	0,96	0,71	7,95	0,55	0,33	0 ± 0,06	
D ₂₂	" 10 sec	11,62	1,63	1,29	9,65	0,80	0,56	0 ± 0,15	
DNS 39	bestrahlt 550 R	29,4	29,47	17,82	16,80	5,13	3,22	1,77	18,3
Eluat	-	25,9	14,32	12,91	19,50	5,47	2,22	1,90	-

V. Elution mit 2 N NH₃

Versuche zur Elution der an die MAK-Säule gebundenen Fraktion unter Anwendung einer von SMITH und BURTON (1966) beschriebenen Elutionsmethode zeigten Erfolg. Die genannten Autoren fraktionierten mit einer stufenweisen Elution T₅-infizierte E.coli-DNS nach ihrem Gehalt an Molekülen der replikativen Form. Sie verfahren dabei folgendermaßen: Auf die Elution mit einem linearen Gradienten von 0,6 bis 1,0 M NaCl + 0,05 M Phosphat pH 6,7 folgte eine Elution mit 1,5 M NaCl + 0,1 M Trispuffer pH 8 und danach mit 1,5 M NaCl + 2 N NH₃-Lösung.

Mit dieser Elutionsfolge konnten wir von bestrahlter DNS in 3 Fraktionen eine nahezu vollständige Ausbeute von der MAK-Säule erzielen. Das Elutionsprofil ist in Abb. 10 wiedergegeben

Abb. 10

Es setzt sich aus folgenden Fraktionen zusammen:

Fraktion I:	10,7 % in 0,4 M NaCl + 0,05 M PO ₄
Fraktion II:	12,3 % in 0,6 bis 1,0 M NaCl + 0,05 M PO ₄
Fraktion III:	61,5 % in 1,5 M NaCl + 2 N NH ₃

Wichtig ist jedoch, daß man vor der Elution mit NH₃ den pH-Wert mit einer Tris-Pufferlösung von 6,7 auf 8,0 erhöht, da ein plötzlicher Anstieg auf 2 N Ammoniaklösung zur Elution von Säulenprotein führt, wie Absorptionsmessungen bei 280 nm zeigten.

Mit thermischer Denaturierung der Fraktion III erreichten wir nur eine Extinktionserhöhung von 8 %; dies bedeutet, daß die DNS in NH₃ zu 80 % denaturiert ist.

Sedimentationsanalysen dieser Fraktion gaben noch keinen weiteren Aufschluß über die Art der zuvor an die Säule gebundenen Moleküle. Das Molekulargewicht der Einzelketten entsprach dem in einer bestrahlten unfraktionierten Probe und bestätigte nochmals, daß die Zahl der Einzelbrüche in der gebundenen sowie in der eluierten Fraktion gleich ist.

D. Diskussion

Mit Hilfe der Chromatographie an methyliertem Albumin auf Kieselgur konnten wir an in vitro bestrahlter Kalbsthymus-DNS einen Strahlenschaden feststellen, der mit den bisher bekannten Strahlenschäden nicht identisch ist. Für die Besprechung unserer Untersuchungen seien zunächst die wesentlichsten Versuchsergebnisse zusammengefaßt:

1. Die bestrahlte DNS wird in einem exponentiellen Verhältnis zur Strahlendosis an die MAK-Säule gebunden. Die Dosiswirkungskurve stellt eine Eintrefferkurve dar. Die D_{37} beträgt 460 R, wenn die DNS bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml 0,01 M NaCl bestrahlt wird.
2. Die Erhöhung der Ionenkonzentration von 0,01 auf 0,4 M NaCl verursacht eine Stabilisierung der Doppelhelixstruktur und der gemessene Strahleneffekt ist geringer.
3. Die Abhängigkeit des Strahlenschadens von der Kettenlänge der DNS ist deutlich. Mechanisch degradierte DNS mit einem mittleren Molekulargewicht von 2 - 3 Millionen ist strahlenresistenter als unbehandelte mit einem Molekulargewicht von 10 - 12 Millionen.
4. Mit Hilfe der Degradierung bestrahlter DNS konnten wir zeigen, daß der Strahlenschaden im Molekül lokal begrenzt ist. Die DNS wird nach geschädigten und ungeschädigten Molekülabschnitten fraktioniert.
5. Bestrahlt man die DNS als Gel von 5 oder 10 mg/ml, so tritt das für die MAK-Säule kritische Ereignis seltener als in verdünnter Lösung auf.
6. Bestrahlung mit ultraviolettem Licht sowie eine thermische Depurinisierung ergeben nur einen schwachen Effekt auf der MAK-Säule.

7. Die Schmelzpunktverschiebung (ein Maß für die Stabilität der Wasserstoffbrücken gegenüber Bestrahlung) ist von der Kettenlänge abhängig. Degradierete DNS erweist sich auch hierbei gegen Strahlung stabiler als undegradierete.

8. Enzymatisch degradierete DNS wurde bezüglich der Zahl der Brüche pro Nukleotidkette untersucht und mit Ultraschall degradierter DNS verglichen. Die Fraktionierung an der MAK-Säule zeigt keine Abhängigkeit von der Zahl der enzymatisch erzeugten Einzelbrüche. Vergleichend dazu wurde die Molekulargewichtsverteilung des Eluats bestrahlter DNS untersucht. Die bestrahlte DNS-Lösung zeigt in der Zahl der Einzelbrüche keinen Unterschied zum Eluat.

9. Mit 2 N Ammoniak-Lösung kann die an die MAK-Säule gebundene Fraktion nahezu vollständig eluiert werden; dies ist eine Bestätigung für die Bindung der strahlengeschädigten Moleküle.

10. Für einen Vergleich unserer Versuchsergebnisse mit definierten in der Literatur beschriebenen strahleninduzierten Veränderungen an der DNS-Struktur bietet sich der G-Wert an, der bei Bestrahlung in wässrigen Lösungen (ohne Berücksichtigung der Verunreinigungen) erhalten wurde.

Für ein Molekulargewicht von 10^7 läßt sich aus unseren Daten ein G-Wert wie folgt berechnen:

Molekulargewicht der DNS 10^7

Konzentration der Lösung 0,5 mg/ml

$3,01 \cdot 10^{13}$ Moleküle befinden sich in 1 ml Lösung

Bei der Dosis von 460 R erhält im Mittel jedes Molekül eine Läsion. Die Energieabsorption beträgt dann

$$460 \cdot 0,612 \cdot 10^{12} \cdot 100 \text{ eV} = 2,82 \cdot 10^{14} \cdot 100 \text{ eV}$$

Die Zahl der Läsionen pro 100 eV absorbierter Energie errechnet sich wie folgt:

$$\frac{3,01 \cdot 10^{13}}{2,82 \cdot 10^{14}} = 0,107$$

Das für die Bindung an die MAK-Säule kritische Ereignis zeigt somit einen G-Wert von $\sim 0,1$. Dieser Wert ist deutlich niedriger als der G-Wert für den Bruch einer Phosphor-esterbindung, welcher etwa 0,4 beträgt (HAGEN 1967), oder für die Zerstörung einer bestimmten Base. Der G-Wert für die Summe aller Basen in der DNS ist etwa 1 (WEISS 1964). Dies bedeutet, daß in einem DNS-Molekül mit einem Molekulargewicht von 10^7 auf eine (für die MAK-Säule kritische) Läsion 4 Einzelbrüche und 10 veränderte Basen kommen. Dies bedeutet, daß es sich bei dem besagten Ereignis nicht um einen bereits bekannten Strahlenschaden handelt. Die unterschiedlichen G-Werte sowie Punkt 5, 6 und 8 schließen Brüche, Vernetzungen oder Basenveränderungen als alleinige Ursache aus.

Dagegen macht die Abhängigkeit von der Ionenkonzentration und der Kettenlänge (Punkt 2 und 3) wahrscheinlich, daß es sich ebenso wie bei der Verschiebung des Schmelzpunktes (Punkt 7) um eine Veränderung der Wasserstoffbindungen handelt. Da der Strahlenschaden lokal begrenzt ist (Punkt 4), könnte man ihn als eine räumlich umschriebene Öffnung der Wasserstoffbindungen in einem nativen DNS-Molekül deuten.

Für die Zerstörung von Wasserstoffbrücken werden im allgemeinen sehr hohe G-Werte angegeben. COX u.a. (1958) haben eine Verschiebung der Titrationskurve infolge der Zunahme basischer Gruppen in der DNS nach Bestrahlung festgestellt. Die Differenz zwischen der Titrationskurve thermisch vollständig denaturierter DNS und bestrahlter DNS wird mit steigender Strahlendosis immer kleiner. Aus diesem Wert berechnen die Autoren G-Werte von 1 bis 65. HAGEN und WILD (1964) untersuchten die Erniedrigung des Schmelzpunktes und die Formaldehydreaktion als ein Maß für die Summe aufgebrochener Wasserstoffbrücken und fanden hierbei G-Werte von 3,8 bis 24,1. In beiden Fällen wurde die gelöste DNS mit sehr hohen Dosen bestrahlt.

Man kann sich das Aufbrechen von Wasserstoffbindungen als eine Kettenreaktion vorstellen, so daß für die einzelnen H-Bindungen hohe G-Werte resultieren. Eine räumlich umschriebene Trennung der beiden Nukleotidstränge könnte dagegen einen viel kleineren G-Wert haben.

Die Versuche mit UV-Licht widersprechen zunächst dieser Annahme, da ja gleichzeitig mit der Veränderung der Nukleotidbase auch Protonenbindungen verloren gehen. Eine entsprechende strahlenbedingte Denaturierung und eine Verschiebung des Schmelzpunktes nach Ultraviolettbestrahlung wurde auch von anderer Seite beobachtet (MARMUR u.a. 1961, HAGEN u.a. 1965). Es ist aber möglich, daß nach UV-Einwirkung größere denaturierte Zonen fehlen, da eine ausgedehnte Trennung der Stränge infolge der gleichzeitig entstehenden intramolekularen Vernetzungen nicht möglich ist (GLIŠIN und DOTY 1962).

Aus Untersuchungen über die Wirkung anderer Agentien als Strahlen, z.B. der Temperatur, weiß man, daß das Öffnen von Wasserstoffbrücken auf bestimmte Bereiche begrenzt sein kann. INMAN (1966) fertigte aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen Verteilungskarten für empfindliche Zonen in der DNS an, von denen aus bei Erhitzen die partielle Auftrennung der beiden Komplementärstränge vor sich geht. Schematisch stellt der Autor diesen Vorgang folgendermaßen dar (Abb. 11):

Abb. 11

Bei der 19 μ langen Doppelstrang-DNS des Phagen λ fanden sich pro Molekül 3 begrenzte Zonen mit ausgeprägter Empfindlichkeit gegenüber Temperaturerhöhung. Die Mittelpunkte dieser Zonen behielten ihre Position bis zu einer Temperatur, bei der gerade noch native Molekülabschnitte zu erkennen waren. Die kleinste partielle Denaturierung ("single site") umfaßte etwa 60 Nukleotidpaare. PEACOCKE u.a. (1962) berechneten 20 Basenpaare als die kleinste, bei der thermischen Denaturierung aufbrechende Einheit.

Weiterhin untersuchte INMAN auch die Lage der "sites" bei Molekülen mit einem oder mehreren Einzelbrüchen und kam zu dem Ergebnis, daß sowohl die Lage der empfindlichen Zonen als auch die Größe derselben unabhängig von der Zahl der Einzelbrüche waren.

Neben diesen thermischen Denaturierungen lassen sich durch Scherkräfte lokale Denaturierungen erzeugen, welche noch keine Hyperchromizität zeigen. HERSHEY u.a. (1963) untersuchten die Wirkung von Scherkräften auf die DNS mit der chromatographischen Fraktionierung an der MAK-Säule. Eine einzige denaturierte Zone in einem Molekül bewirkt eine feste Bindung desselben an die MAK-Säule. Ferner wurde gezeigt, daß die Empfindlichkeit der DNS bezüglich der lokalen Denaturierung mit der Kettenlänge zunimmt und zur Mitte des Moleküls hin am höchsten ist. Mit Hilfe der Saccharosezentrifugation wies HERSHEY nach, daß die lokalen Denaturierungen keine präformierten Bruchstellen sind. Er erklärt es damit, daß ein Kettenmolekül an der Stelle, an der es seine geordnete Stabilität verloren hat, freier beweglich und stärker geknäuelte und damit gegen mechanische Kräfte unempfindlich wird.

Die Übereinstimmung dieser Befunde mit unseren Ergebnissen läßt annehmen, daß es sich auch in unserem Fall um eine lokale Denaturierung handelt.

Das Zustandekommen solcher lokalen Denaturierungen in Makromolekülen nach Bestrahlung läßt sich mit der von PLATZMAN und FRANCK (1958) beschriebenen Wirkungsweise ionisierender Strahlen erklären. Den genannten Autoren zufolge werden durch das spontane Auftreten elektrischer Ladungen im Innern eines Protein- oder DNS-Moleküls die polarisierbaren Seitengruppen derart ausgerichtet, daß mehrere schwache Bindungen, z.B. Wasserstoffbrücken simultan aufbrechen. Da die Stärke der Polarisationswelle vom Entstehungszentrum nach den Seiten hin abnimmt, bleibt das Aufbrechen von Wasserstoffbindungen auf einen Bereich im Molekül begrenzt. Der G-Wert von 0,1 besagt in unserem Fall,

daß nicht jede primäre Ionisation zu dieser spezifischen Läsion führt, sondern erst jede 10. Ionisation eine für die MAK-Säule erkennbare lokale Denaturierung verursacht.

Dieser von PLATZMAN und FRANCK diskutierte Mechanismus gibt darüber hinaus eine Möglichkeit, die unterschiedliche Empfindlichkeit der DNS-Struktur gegenüber ionisierenden Strahlen und ultraviolettem Licht zu erklären.

Die strahlenbedingten denaturierten Zonen scheinen ferner eine große Ähnlichkeit mit der Stelle der Replikation in einer Doppelstrang-DNS zu besitzen. In verschiedenen chromatographischen und anderen Fraktionierungssystemen zeigen sie gleiches Verhalten (KIDSON und KIRBY 1964, KIDSON 1966). Die Trennung der normalen DNS von der replikativen DNS an der MAK-Säule wurde von PAOLETTI u.a. (1966) sowie von SMITH und BURTON (1966) durchgeführt. Die Eluierbarkeit der gebundenen Fraktion (welche die replikative Form enthält) mit Ammoniak besteht ebenfalls für bestrahlte DNS.

Auch bei der Transcription, d.h. der Ablesung des genetischen Code durch die RNS-Nukleotidyltransferase während der RNS-Synthese, sind die DNS-Stränge partiell denaturiert (ANTHONY u.a. 1966, WALTER u.a. 1967), jedoch besteht noch keine gesicherte Vorstellung über die Ausdehnung dieser denaturierten Zonen.

Ein enzymatischer Nachweis partieller Denaturierungen in der DNS wurde von HERSHEY u.a. (1963) mit Phosphodiesterase I (nach LEHMAN) geführt; dieses Enzym ist spezifisch für Einzelstrang-DNS, es benötigt 3' OH-Gruppen als Startpunkte. Es ist daher anzunehmen, daß die denaturierten Zonen nur dann erfaßt werden können, wenn sie an der Stelle eines Einzelbruchs entstehen.

Da die Chromatographie an der MAK-Säule allein keine quantitativen Angaben zuläßt, gäbe ein solcher enzymatischer Test gewiß eine Möglichkeit, weitere Aussagen über die Art und insbesondere über die Ausdehnung der durch ionisierende Strahlen verursachten denaturierten Zonen zu machen.

E. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird über einen chromatographisch nachweisbaren Strahlenschaden an bestrahlter Desoxyribonukleinsäure berichtet. Charakteristisch für diesen Strahlenschaden ist eine außergewöhnliche Bindung der DNS an eine Säule aus methyliertem Albumin auf Kieselgur. Die Bindung an die MAK-Säule steht in einem exponentiellen Verhältnis zur Strahlendosis. Dies besagt, daß eine Läsion pro Molekül genügt, um das ganze Molekül an die Säule zu binden.

Die Strahlenempfindlichkeit der DNS in bezug auf die Bindung an die Säule ist von der Ionenkonzentration der Lösung abhängig. Mit Ultraschall degradierte DNS eluiert wesentlich besser von der Säule und verhält sich resistenter gegen Strahlung als unbehandelte DNS. Diese Resistenz kurzer DNS-Ketten zeigt sich auch in bezug auf die strahlenbedingte Verschiebung des Schmelzpunktes. Nach mechanischer Degradierung bestrahlter DNS wird die Fraktion ungeschädigter Moleküle erhöht. Dies bedeutet, daß es in bestrahlter DNS Molekülabschnitte gibt, die keinen Strahlenschaden aufweisen und der Schaden folglich lokal begrenzt ist.

Durch vergleichende Untersuchungen mit bereits bekannten Strahlenschäden lassen sich Vernetzungen, Basenschädigungen und Brüche als alleinige Ursache für die Bindung an die MAK-Säule ausschließen. Dagegen ist es wahrscheinlich, daß die Bindung des DNS-Moleküls durch begrenzte Zonen mit aufgebrochenen Wasserstoffbrücken hervorgerufen wird. Solche Zonen wurden auch von anderen Autoren nach Einwirkung von Scherkräften oder Erhitzen beobachtet und als lokale Denaturierung bezeichnet.

Die Häufigkeit dieser Läsion pro 100 eV absorbierten Energie beträgt 0,1. Dieser Wert wird vergleichend mit G-Werten für bekannte Strahlenschäden diskutiert. Er besagt, daß es sich bei dem Öffnen einer bestimmten Anzahl von Wasserstoffbindungen um eine Folgereaktion handelt; offenbar ist nicht jede Ionisation imstande, eine lokale Denaturierung zu verursachen.

F. Literaturverzeichnis

ALEXANDER, P., and J.T. LETT (1960)

Role of Oxygen in the Cross-linking and Degradation of Deoxyribonucleic Acid by Ionizing Radiation.

Nature 187, 933

ANTHONY, D.D., E. ZESZOTEK, and D.A. GOLDTHWAIT (1966)

Initiation by the DNA-dependent RNA Polymerase.

Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 1026

BENDICH, A., H.B. PAHL, and G.C. KORNGOLD (1958)

Fractionation of Deoxyribonucleic Acid on Columns of Anion Exchangers.

J. Amer. Chem. Soc. 80, 3949

BERNARDI, G., and C. SADRON (1964)

Studies on Acid Deoxyribonuclease. I. Kinetics of the Initial Degradation of DNA by Acid DNAase.

Biochemistry 3, 1411

BOWEN, E.J. (1949)

Photochemical Technique to Determine Quantum Efficiency.

In: The chemical Aspects of Light 2nd revised Ed.

Oxford Univ. Press New York.

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. (1956)

The Actions of Ionizing Radiations on Biological Materials.

Rad. Res. 4, 20

BUTLER, J.A.V. (1959)

Changes Induced in Nucleic Acids by Ionizing Radiations and Chemicals.

Rad. Res. Suppl. 1, 403

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

Microdetermination of Phosphorus.

Analyt. Chem. 28, 1756

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

C.M. WHEELER (1965)

Chain Scission and Hydrogen Bond Breakage on Irradiation
of DNA.

Rad. Res. 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, T., L. BOHNE und U. HAGEN

Manuskript in Vorbereitung.

COX, R.A., W.G. OVEREND, R.A. PEACOCKE, and S. WILSON (1958)

The Action of γ -Rays on Sodium Deoxyribonucleate in Solution.

Proc. Roy. Soc. 149, 511

DAS GUPTA, N.N., M. SARKAR, and D.N. MISRA (1966)

Electron Microscopic Studies on Denatured DNA from E.coli.

J. Mol. Biol. 15, 619

DAVIS, M. (1953)

Irradiation of T-1 Bacteriophage with Low-Voltage Electrons.

Arch. Bioch. and Bioph. 49, 417

DAVISON, P.F., D. FREIFELDER, and B.W. HOLLOWAY (1964)

Interruption in the Polynucleotide Strands in Bacterio-
phage DNA.

J. Mol. Biol. 8, 1

DISCHE, Z. (1930)

Neue charakteristische Farbreaktion der Thymonukleinsäure
und Mikromethoden zur Bestimmung derselben in tierischen
Organen mit Hilfe dieser Reaktion.

Mikrochemie 8, 4

EIGNER, J., and P. DOTY (1965)

The Native, Denatured and Renatured States of Deoxyribonucleic Acid.

J. Mol. Biol. 12, 549

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

Chemical Effects of Ionizing Radiation on Nucleic Acid and Nucleoproteins.

Nature 187, 319

FRAENKEL-CONRAT, and H.S. OLSCOTT (1945)

Esterification of Proteins with Alcohols of Low Molecular Weight.

J. Biol. Chem. 161, 259

GLIŠIN, V.R., and P. DOTY (1962)

The Effect of Temperature on the Cross-linking of Deoxyribonucleic Acid Strands by Ultraviolet Radiation.

Biochim. Biophys. Acta 61, 458

GREER, S., and S. ZAMENHOF (1959)

Loss of Purines from DNA Heated in Mutagenic Conditions of Physiologic pH.

Feder. Proc. 18, 238

HAGEN, U. (1962)

Radiosensitivity of Hydrogen Bonds in Deoxyribonucleic Acid.

Nature 194, 182

HAGEN, U. (1967)

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

Biochim. Biophys. Acta 134, 45

HAGEN, U., K. KECK, H. KRÖGER, F. ZIMMERMANN, and TH. LÜCKING (1965)

Ultraviolet Light Inactivation of the Priming Ability of DNA in the RNA Polymerase System.

Biochim. Biophys. Acta 95, 418

HAGEN, U. und H. WELLSTEIN (1965)

Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der DNS.
III. Brüche und Vernetzungen nach direkter Bestrahlung.
Strahlentherapie 128, 565

HAGEN, U. und R. WILD (1964)

Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der DNS.
I. Die Empfindlichkeit der Wasserstoffbrücken.
Strahlentherapie 124, 215

HAYASHI, M.N., M. HAYASHI, and S. SPIEGELMAN (1965)

Chromatographic Separation of Annealed and Enzymatically
Synthesized RNA-DNA Hybrids.
Bioph. J. 5, 231

HERSHEY, A.D., E. GOLDBERG, E. BURGI, and L. INGRAHAM (1963)

Local Denaturation of DNA by Shearing Forces and by Heat.
J. Mol. Biol. 6, 230

HOTZ, G. (1966)

Chemische und physikalische Beeinflussung der Strahlen-
wirkung auf Coliphagen.
Habilitationsschrift, Technische Hochschule Karlsruhe

INMAN, R.B. (1966)

A Denaturation Map of the λ Phage DNA Molecule determined
by Electron Microscopy.
J. Mol. Biol. 18, 464

KAY, E.R.M., N.S. SIMMONS, and A.L. DOUNCE (1952)

An improved Preparation of Sodium - Deoxyribonucleate.
J. Amer. Chem. Soc. 74, 1724

KIDSON, C. (1966)

DNA secondary structure in the region of the replication
point.
J. Mol. Biol. 17, 1

KIDSON, C., and K.S. KIRBY (1964)

Fractionation of DNA. II. Partial Strand Separation as a
Basis of Fractionation by Countercurrent Distribution.
Biochim. Biophys. Acta 91, 627

LERMAN, L.S. (1955)

Chromatography on a Column Consisting of Methylated Albumin (bovine serum) Mixed with twenty Parts of Celite.

Biochim. Biophys. Acta 18, 132

LETT, J.T., and K.A. STACEY (1960)

The Relationship between Molecular Weight and Viscosity as a Criterion of Damage in Deoxyribonucleic Acid (DNA).

Makromolekulare Chemie 38, 204

LITTLETON, J.W., and G.B. PETERSEN (1964)

The Isolation of DNA from Plant Tissues.

Biochim. Biophys. Acta 80, 391

LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR, and R.J. RANDALL (1951)

Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265

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

MANDELL, J.D., and A.D. HERSHEY (1960)

A Fractionating Column for Analysis of Nucleic Acids.

Analyt. Biochem. 1, 66

MARMUR, J., W.F. ANDERSON, L. MATTEWS, K. BERENS, E. GAJEWSKA, D. LANE, and P. DOTY (1961)

The Effects of Ultraviolet Light on the Biological and Physical Chemical Properties of Deoxyribonucleic Acids.

J. Cellul. and Comparat. Physiology 58, 33

PAOLETTI, C., N. DUTHEILLET-LAMONTHEZIE, PH. JEANTEUR, and A. OBRENOVITCH (1966)

Studies on DNA Replication in animal cells.

Euratom, Annual Report, Villejuif, France.

PEACOCKE, A.R., and J.O. WALKER (1962)

The Thermal Denaturation of Sodium Deoxyribonucleate.
II. Kinetics.

J. Mol. Biol. 5, 550

PLATZMAN, R., and J. FRANCK (1958)

A Physical Mechanism for the Inactivation of Proteins by
Ionizing Radiation.

Symposium on Information Theory in Biology, Pergamon Press,
London

SETLOW, R., and R. BOYCE (1963)

The Action Spectra for Ultraviolet Light Inactivation of
Systems Containing 5-Bromouracil-Substituted Deoxyribo-
nucleic Acid. II. Bacteriophage T4.

Biochim. Biophys. Acta 68, 455

SMITH, M.G., and K. BURTON (1966)

Fractionation of Deoxyribonucleic Acid from Phage-Infected
Bacteria.

Biochem. J. 98, 229

STUDIER, F.W. (1965)

Sedimentation Studies of the Size and Shape of DNA.

J. Mol. Biol. 11, 373

SUEOKA, N., and TS'AI-YING CHENG (1962)

Fractionation of Nucleic Acids with the Methylated
Albumin Column.

J. Mol. Biol. 4, 161

TESSMAN, E.S. (1956)

Growth and Mutation of Phage T1 on Ultraviolet-Irradiated
Host Cells.

Virology 2, 679

THOMAS, C.A. Jr. (1956)

The Enzymatic Degradation of Deoxyribose Nucleic Acid.

J. Am. Chem. Soc. 78, 1861

VOKIN, E., and E.E. COHN (1954, 1957)

Estimation of nucleic acids.

Methods of Biochem. Analysis Vol. I, 287, New York

WALTER, G., W. ZILLIG, P. PALM und E. FUCHS (1967)

Die Initiationsphase der RNS-Synthese durch DNS-abhängige RNS-Polymerase.

Frühjahrs-Tagung der Gesellschaft für Biologische Chemie, Tübingen 1967

WEBB, J.M., and H.B. LEVY (1955)

A Sensitive Method for the Determination of Deoxyribonucleic Acid in Tissues and Microorganisms.

J. Biol. Chem. 213, 107

WEISS, J.J. (1964)

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

Progress in Nucleic Acid Res. 3, 103

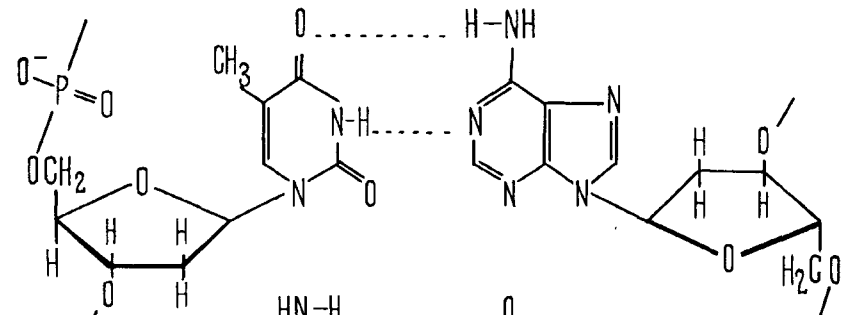
ZIMMERMANN, F., H. KRÖGER, U. HAGEN, and K. KECK (1964)

The Effect of X-Irradiation on the Priming Ability of DNA in the RNA-Polymerase System.

Biochim. Biophys. Acta 87, 160

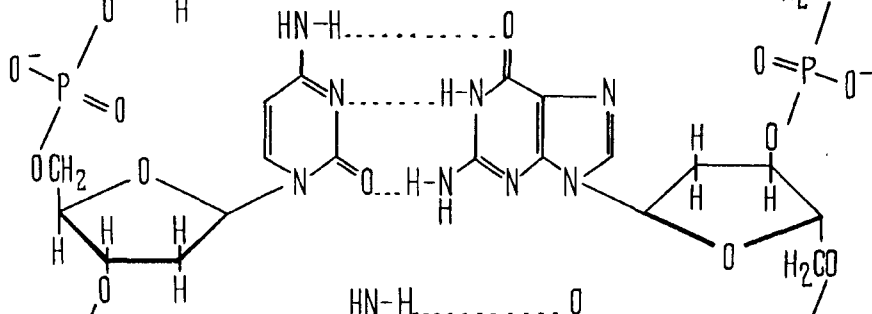
Abb. 1: Struktur der Desoxyribonukleinsäure mit Wasserstoffbrücken.

Thymin-
monophosphat



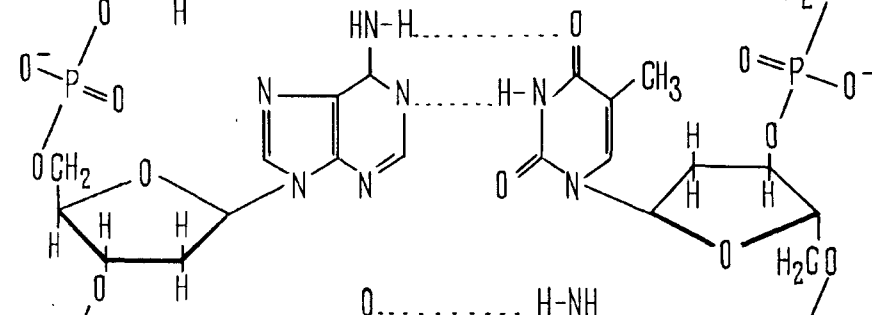
Desoxyadenosin-
monophosphat

Desoxycytidin-
monophosphat



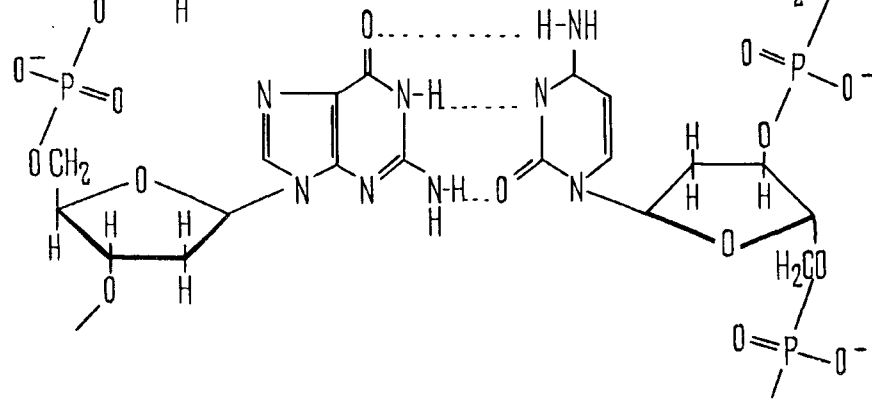
Desoxyguanosin-
monophosphat

Desoxyadenosin-
monophosphat



Thymin-
monophosphat

Desoxyguanosin-
monophosphat



Desoxycytidin-
monophosphat

Abb. 2: Elutionsprofil einer Kalbsthymus DNS an methylier-
tem Albumin auf Kieselgur. ————— native DNS,
----- degradierte DNS (Ultraschall).

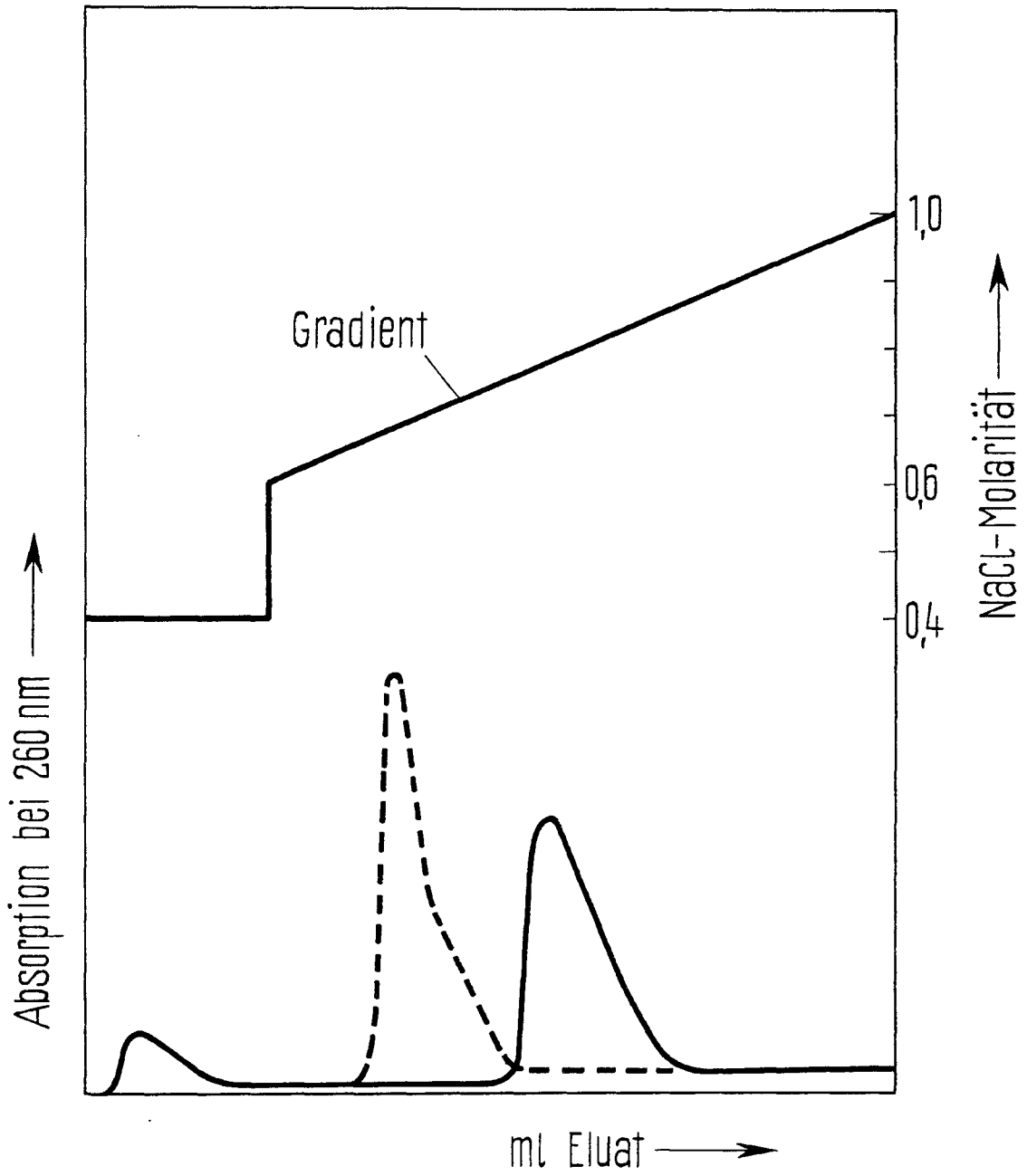


Abb. 3: Bindung bestrahlter DNS an die MAK-Säule.
Dargestellt sind Werte aus 6 DNS-Präparationen.
(Konzentration 0,5 mg/ml).

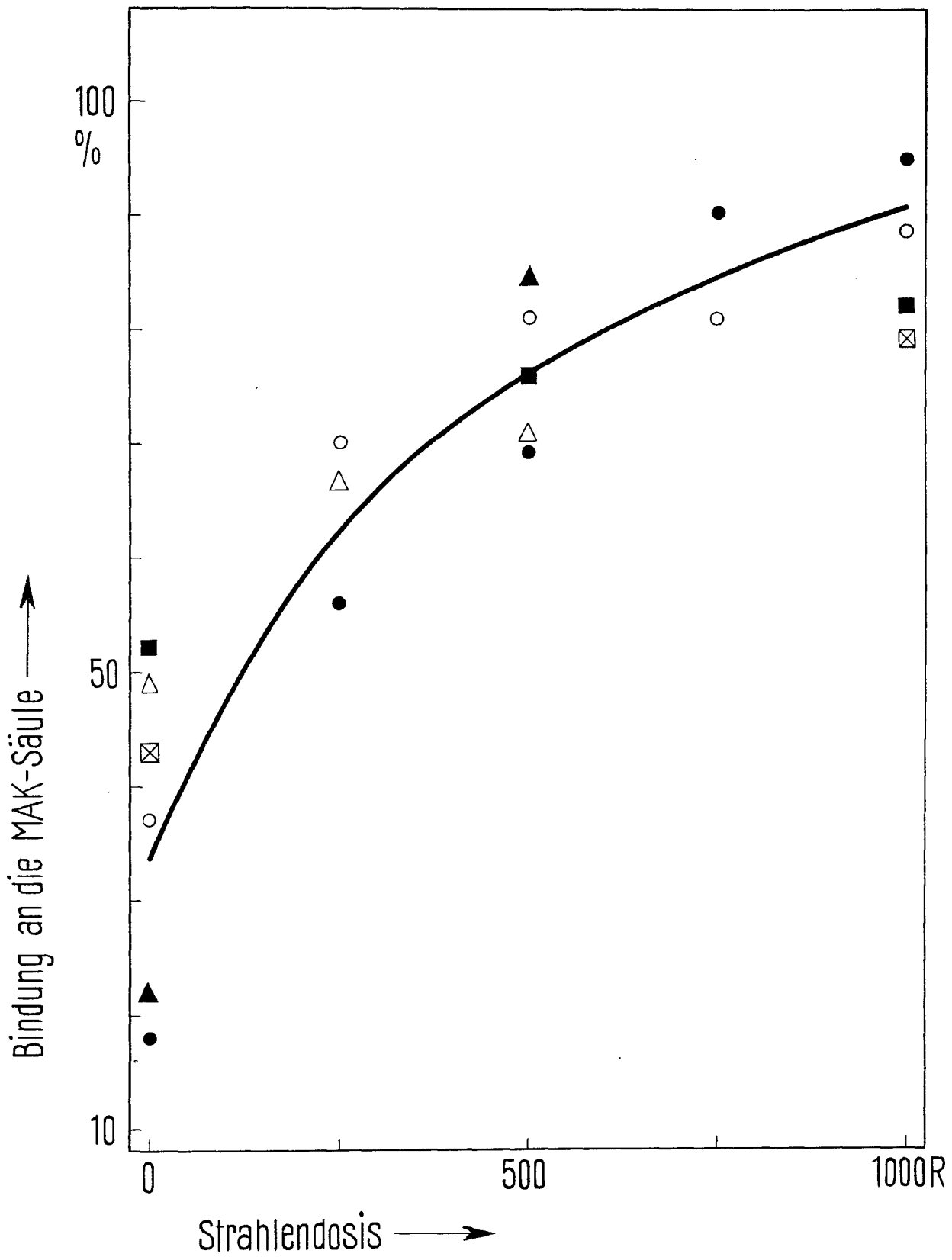


Abb. 4: Elution bestrahlter DNS von der MAK-Säule.
Der Wert unbestrahlter DNS ist mit 100 %
angenommen. (Konzentration während der
Bestrahlung 0,5 mg/ml, Ionenstärke 0,01 M
NaCl).

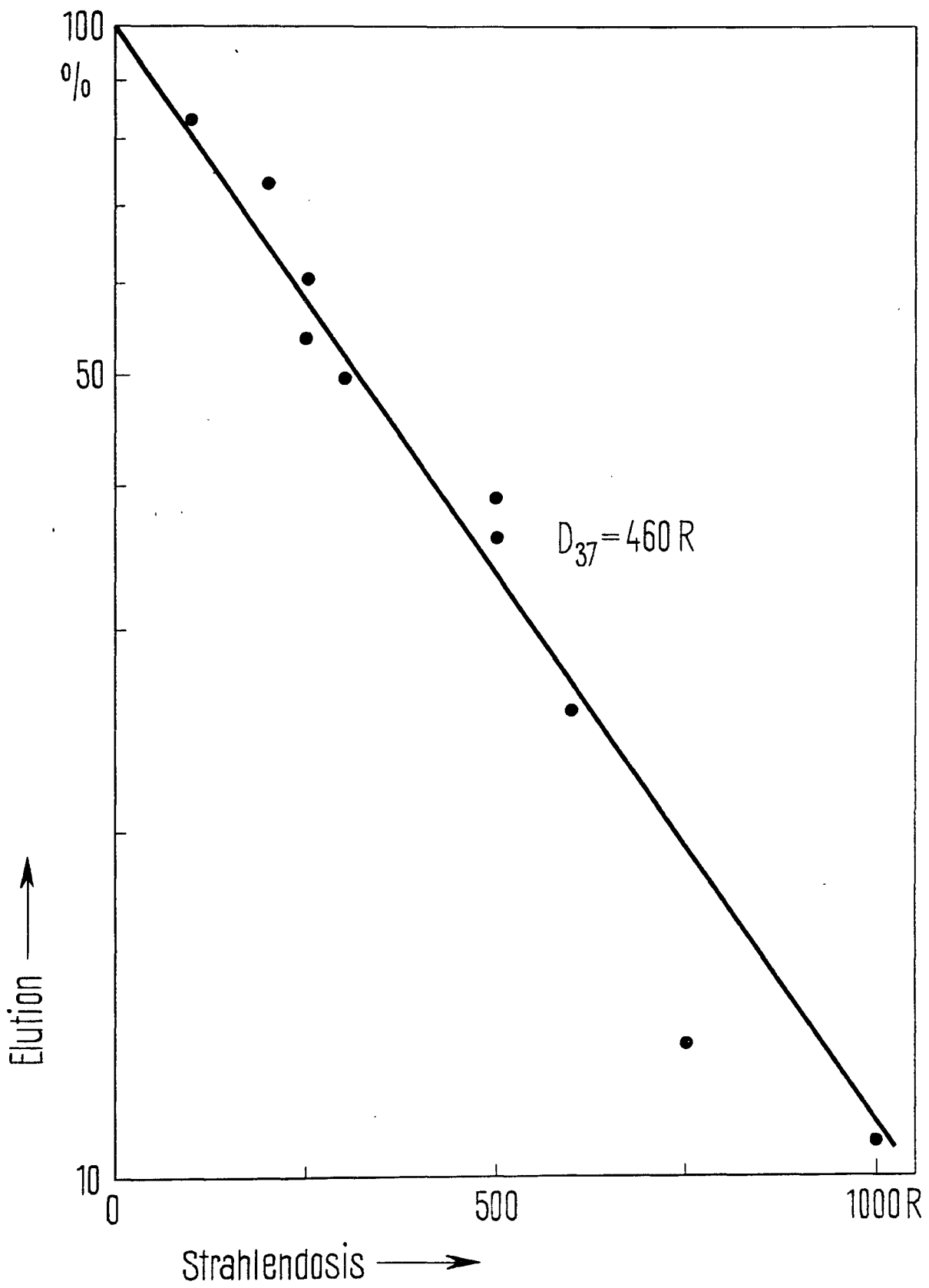


Abb. 5: Bestrahlung degradiertes DNS. Das Molekulargewicht wurde vor der Bestrahlung auf ein Viertel reduziert. (Konzentration während der Bestrahlung 0,5 mg/ml, Ionenstärke 0,01 M NaCl). Die Meßpunkte sind Werte aus 3 DNS-Präparationen mit je 2 Fraktionierungen.

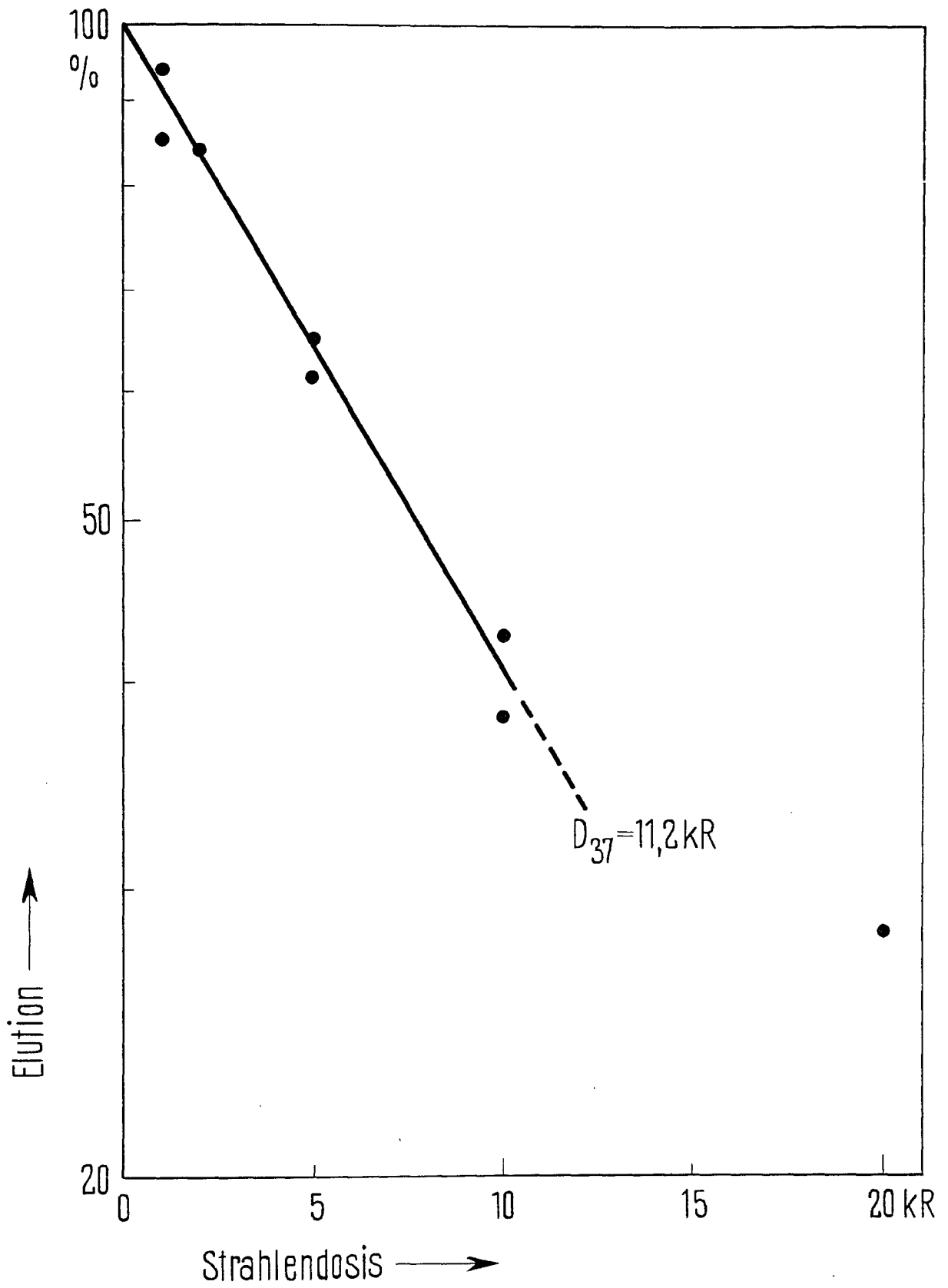


Abb. 6: Degradierung bestrahlter DNS. Das Molekulargewicht wurde nach der Bestrahlung auf ein Viertel reduziert. ----- Dosiseffektkurve der Elution unbehandelter DNS (Abb. 4).

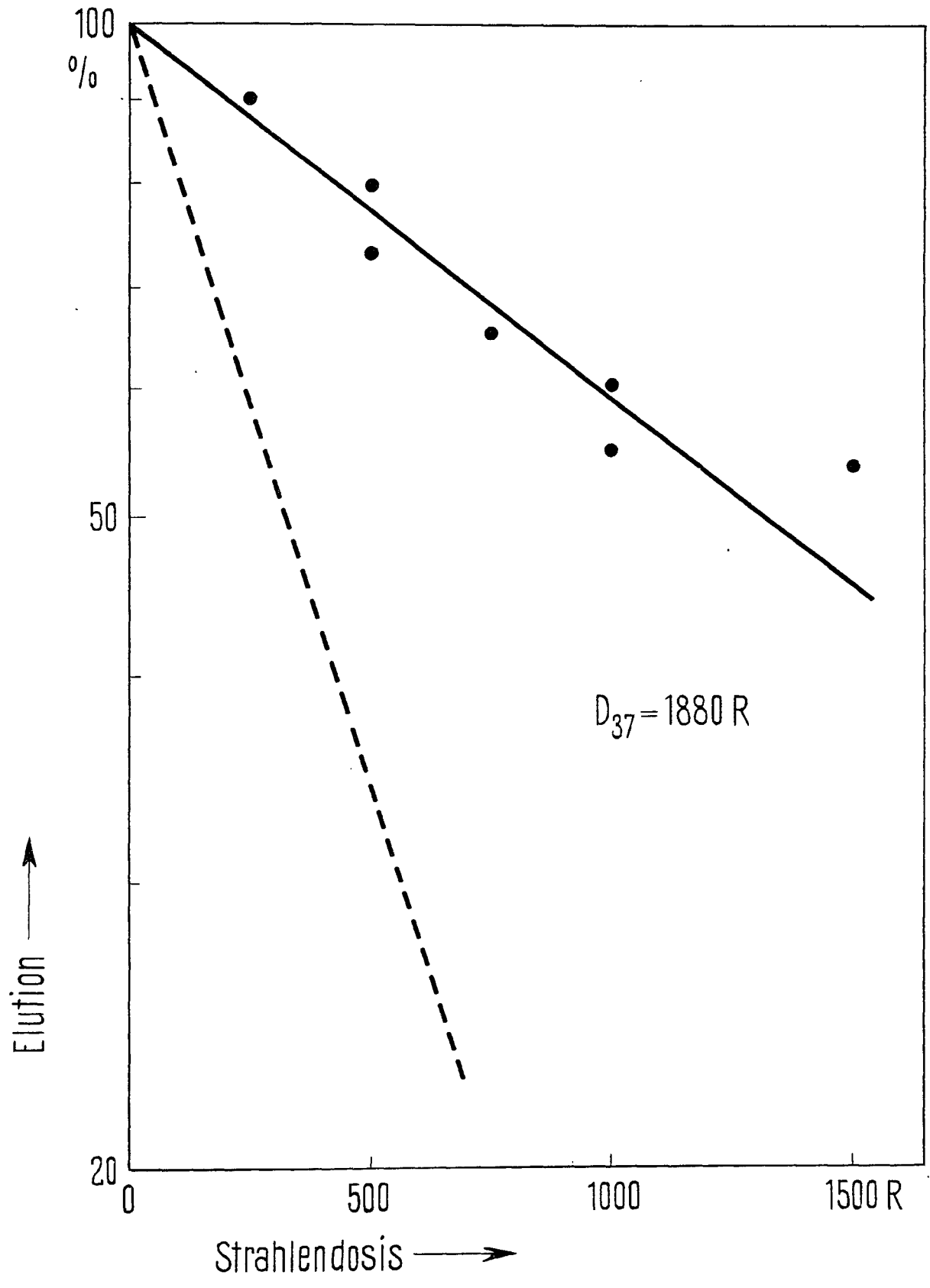


Abb. 7: Bestrahlung von DNS als Gel. Offene Symbole
5 mg/ml, geschlossene Symbole 10 mg/ml.
Ionenstärke 0,01 M NaCl. Die Meßpunkte sind
Mittelwerte aus 2 Versuchen.

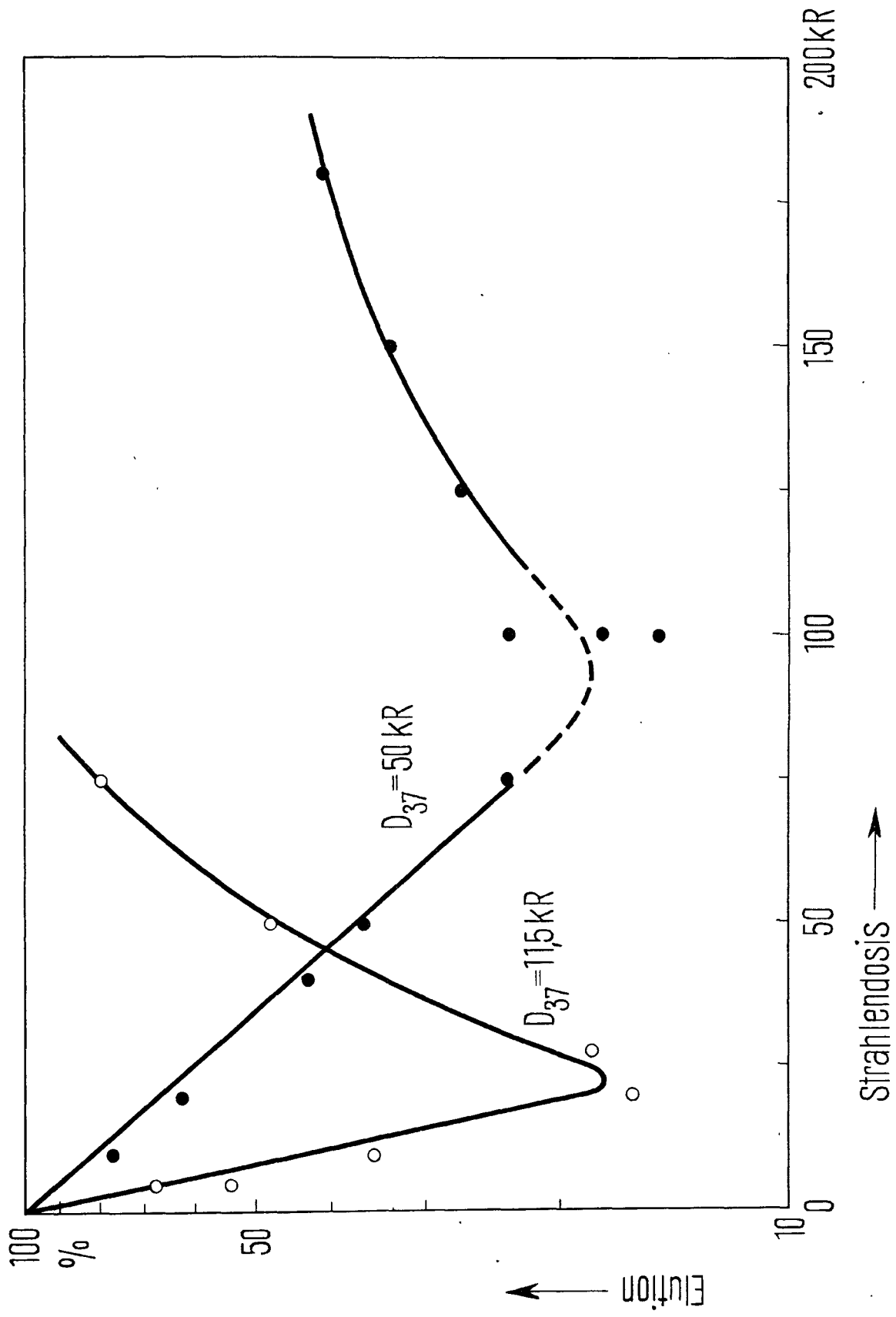


Abb. 8: Bestrahlung von DNS mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 253,7 nm. (Konzentration während der Bestrahlung 0,2 mg/ml, Ionenstärke 0,01 M NaCl). Meßpunkte sind Mittelwerte aus 4 Fraktionierungen.

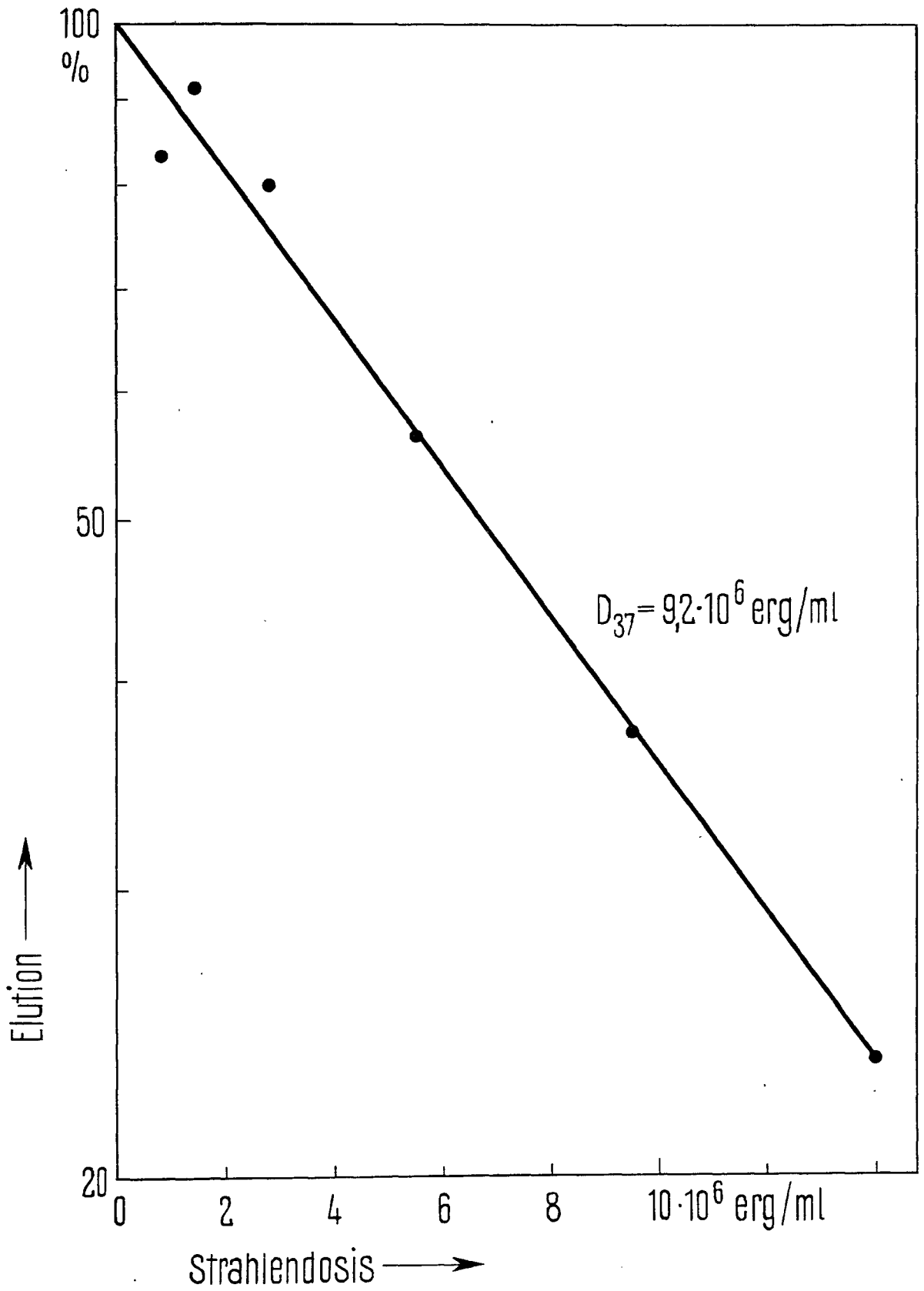


Abb. 9: Schmelz- und Renaturierungskurven von degradiertem DNS in 0,2 M NaCl. — Kontrolle $T_m = 85,6 \text{ }^\circ\text{C}$,
----- nach Bestrahlung mit 50 kR γ -Strahlen $T_m = 80,0 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Kurven für 4 kR und 10 kR stimmen mit der Kontrolle überein.

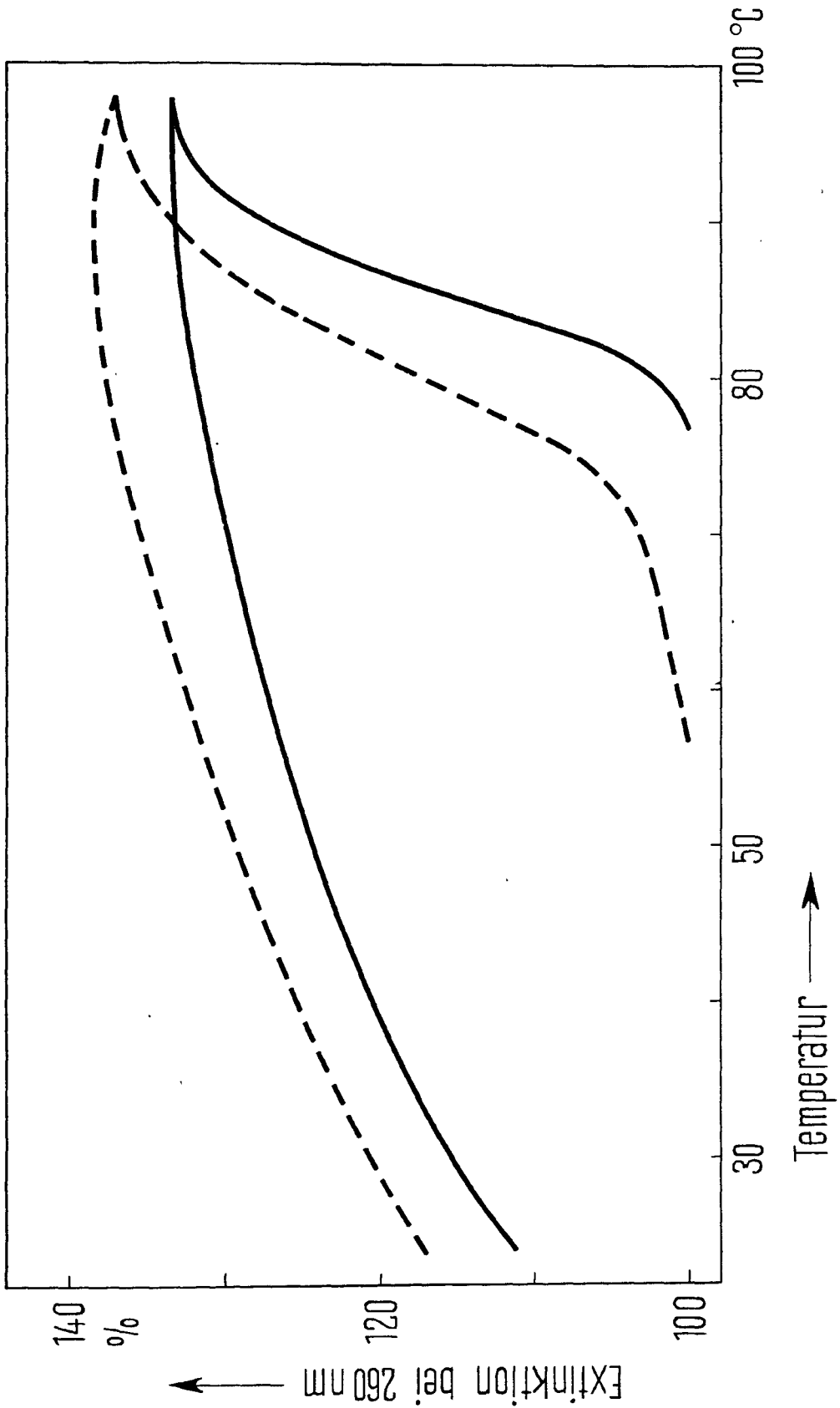


Abb. 10: Elutionsprofil einer bestrahlten DNS mit
3 Elutionsstufen.

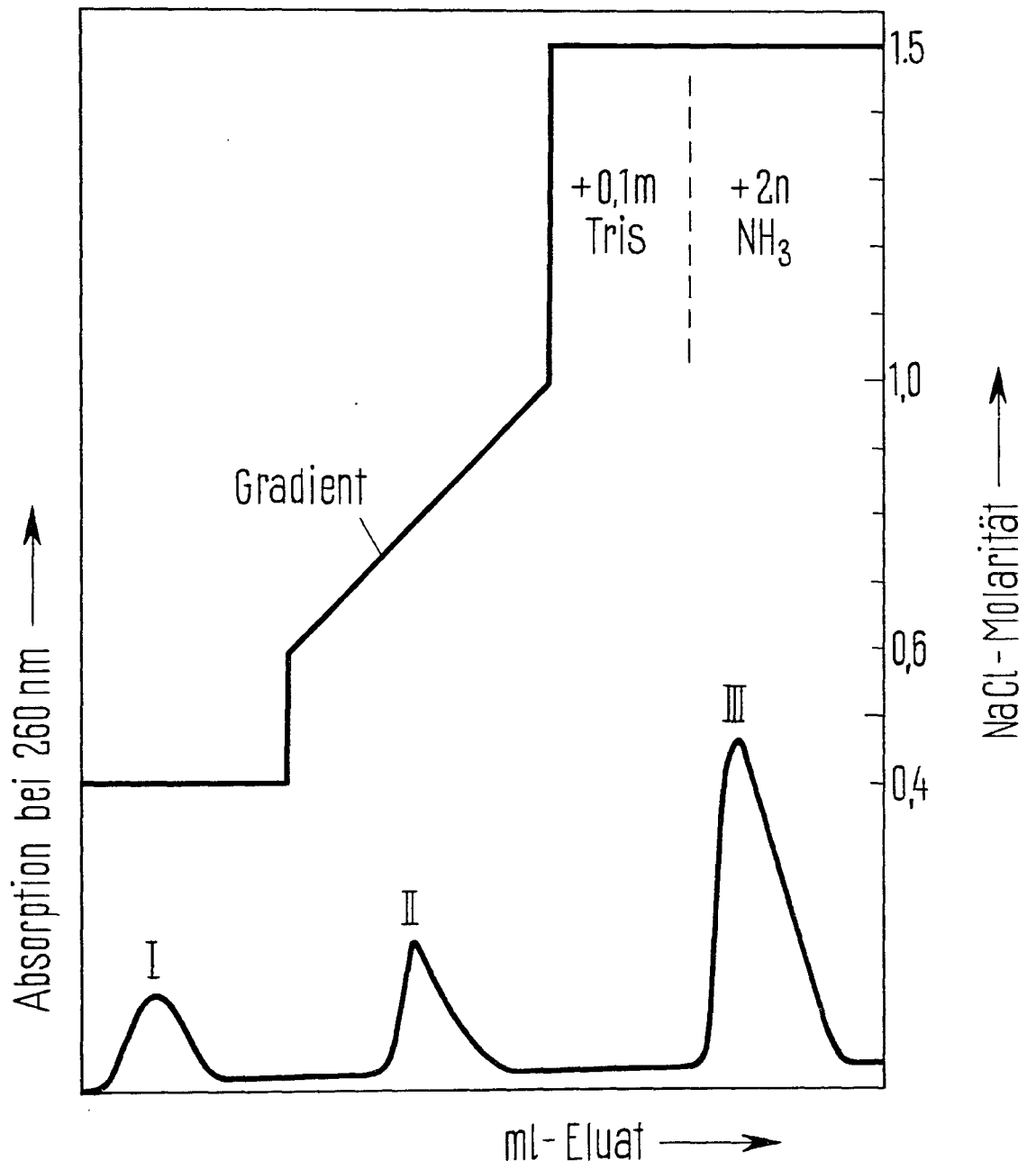


Abb. 11: Schematische Darstellung der partiell denaturierten DNS-Doppelhelix des Phagen λ (nach INMAN 1966).

A: Kettenanfang; B, C, D sind Zonen, deren Wasserstoffbrücken labil sind.

⌘ "multiple sites", | "single sites".

