

GSi

GSi-91-08
REPORT
MAERZ 1991
ISSN 0171-4546

**UNTERSUCHUNG ZUR ANWENDUNG ELEKTROOPTISCHER
MESSUNGEN FÜR DIE DETEKTION VON STRAHLEN-
INDUZIERTEN EINZELSTRANGBRÜCHEN AN PLASMID-DNA**

N. HELLMANN

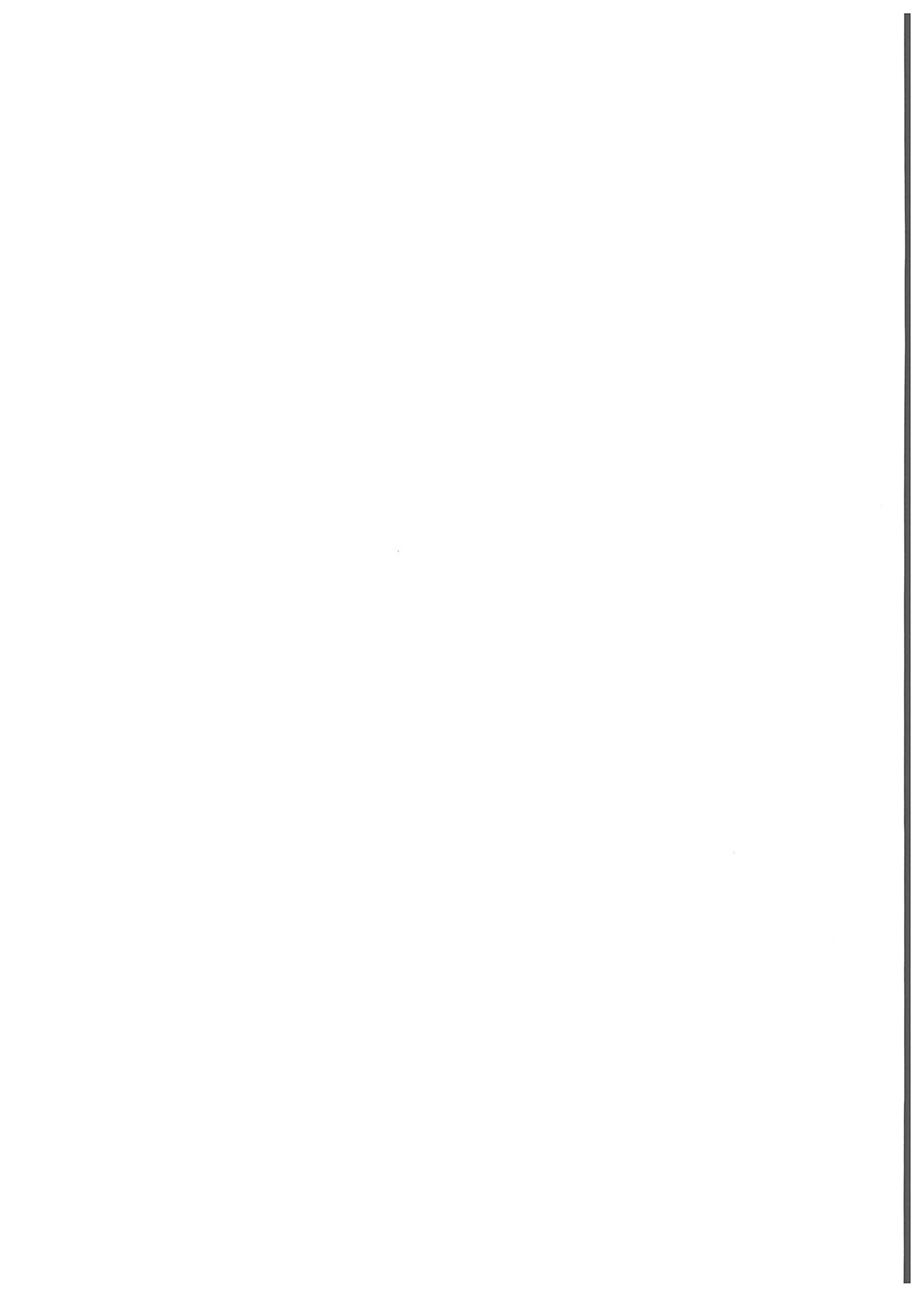
(Diplomarbeit, Universität Heidelberg)

Gesellschaft für Schwerionenforschung mbH
Planckstr. 1 · Postfach 11 05 52 · D-6100 Darmstadt 11 · Germany

**Untersuchung zur Anwendung elektrooptischer Messungen
für die Detektion von strahleninduzierten Einzelstrangbrüchen
an Plasmid-DNA**

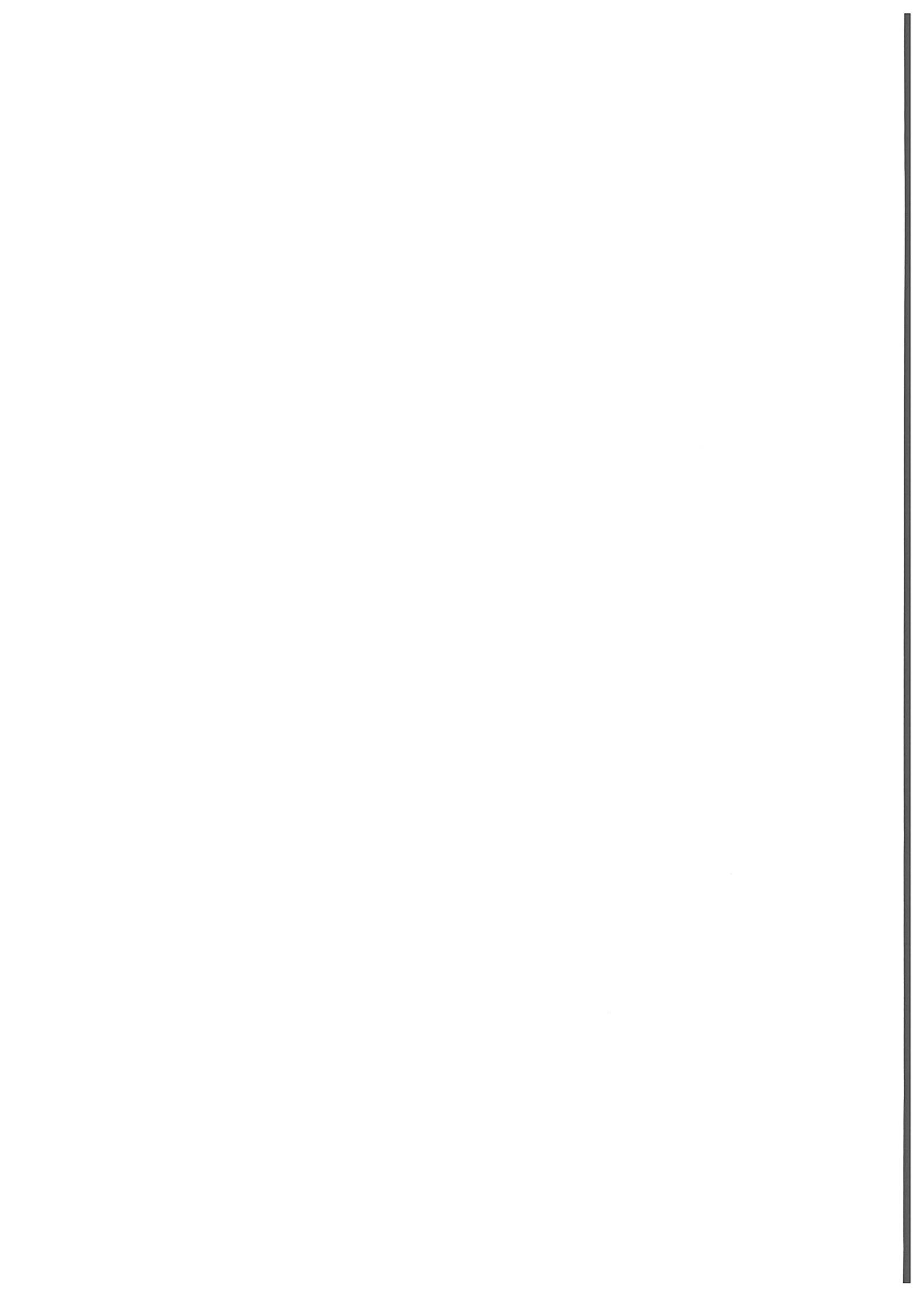
**Diplomarbeit
vorgelegt von
Nadja Hellmann**

GSI, Darmstadt
Universität Heidelberg
1991



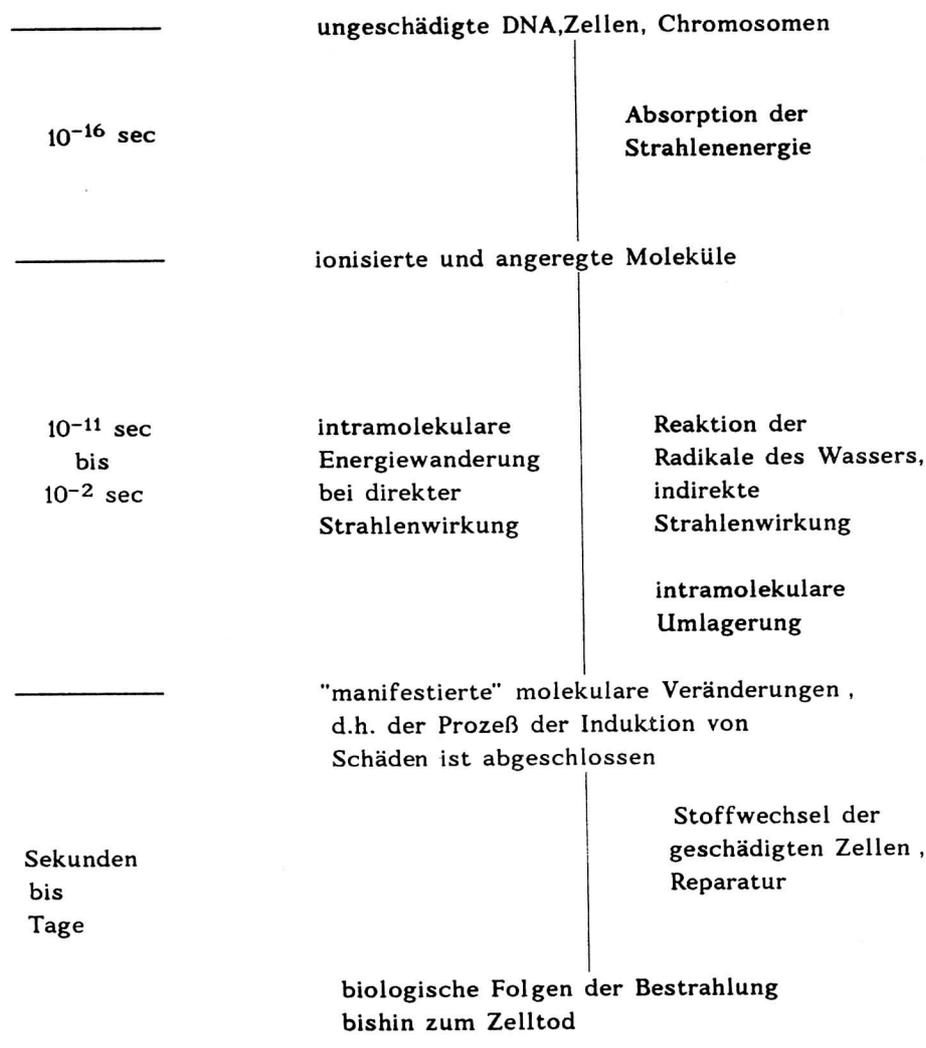
Inhaltsverzeichnis

0. Einleitung	1
1. Physikalische Grundlagen	3
1.1 Brechungsindex einer Lösung mit optisch anisotropen Molekülen	3
1.2 Rotationsdiffusionskoeffizient	6
1.3 Brechungsindex und Phasendifferenz	7
2. DNA-Moleküle und Strahlenwirkung	8
2.1 Aufbau der DNA	8
2.2 Plasmidstruktur	10
2.3 Bestrahlung von biologischen Proben	11
2.3.1 Röntgenstrahlung	11
2.3.2 Schwere Ionen	11
2.3.3 Linearer Energietransfer	12
2.4 Strahlenschäden	12
3. Material und Methode	13
3.1 Biologische Proben	13
3.2 Bestrahlung der Proben	13
3.2.1 Röntgen-Versuche	13
3.2.2 Bestrahlung am UNILAC	13
3.3 Referenzmessung : Gel-Elektrophorese	15
3.4 Aufbau der Apparatur	16
3.4.1 Optischer Aufbau	16
3.4.2 Elektronischer Aufbau	18
3.5 Durchführung der Messungen	20
3.6 Datenaufnahme und Analyse	21
4. Ergebnisse	22
4.1 Messungen am Plasmid PHW	23
4.1.1 Vergleiche mit berechneten Kurven	26
4.1.2 Reproduzierbarkeit der Parameter	27
4.2 Einfluß von äußeren Bedingungen	31
4.2.1 Feldstärke und Pulsdauer	31
4.2.2 Einfluß des Meßprozesses	32
4.2.3 Zusammensetzung und Konzentration der Pufferlösung	33
4.3 Weitere Messungen	34
4.3.1 SV40 5200 bp	34
4.3.2 PUC 2700 bp	35
5. Zusammenfassung und Diskussion	38
5.1 Zusammenfassung	38
5.2 Ausblick	40



0. Einleitung

Die Bestrahlung von biologischen Proben führt zu Veränderungen, die sich in ihrer Natur und bezüglich der Zeitskala in 3 Klassen unterteilen lassen:



Bei der Bestrahlung von lebenden Zellen wird die Häufigkeit des induzierten biologischen Schadens in Form von Dosis-Effekt-Kurven, die Zeitabhängigkeit mittels Reparaturkinetik untersucht. Biochemische Veränderungen am Erbmateriale werden an Chromosomen und DNA-Molekülen studiert. Das Hauptaugenmerk bei der Untersuchung von DNA liegt auf der Detektion von strahleninduzierten Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Während Strangbrüche in der Zelle repariert werden können, bleibt bei extrazellulärer DNA der Schaden erhalten, ist also als Informationsquelle über die Wirksamkeit der Strahlung solange verfügbar als das DNA-Molekül stabil ist. Zur Untersuchung der DNA-Integrität wird meist die Gel-Elektrophorese verwendet, die Analyse dauern von mehreren Stunden erfordert.

Um Aussagen über den Zeitablauf der Vorgänge machen zu können, die auf chemischem und biochemischem Wege zu den Strangbrüchen führen (Radikalbildung und -migration), benötigt man eine Methode, die Messungen erlaubt, die im Sub-Millisekunden-Bereich nach der Bestrahlung begonnen und abge-

geschlossen werden können . Man könnte dann versuchen , damit zwischen Strangbrüchen zu unterscheiden , die direkt durch die ionisierende Strahlung entstehen , und jenem Anteil , der nach den chemischen Vorgängen induziert wird . Elektrooptische Messungen , wie sie schon lange zur Bestimmung von Molekülgrößen sowie deren elektrischen Eigenschaften verwendet werden , zeichnen sich durch Schnelligkeit des Meßvorgangs und Einfachheit des Aufbaus aus . DNA-Moleküle eignen sich aufgrund ihrer optischen Anisotropie für solche Messungen . Die optische Polarisierbarkeit ist bei diesen Molekülen durch die aromatischen Ringe bestimmt und wegen der gestapelte Anordnung der Ringe (base stacking) richtungsabhängig . Dies hat zur Folge , daß durch Orientieren der Moleküle in einer Lösung die molekulare Anisotropie aller DNA-Moleküle zu einem makroskopisch meßbaren Effekt zusammenwirken : der Brechungsindex der Lösung wird anisotrop . Bei elektrooptischen Messungen wird die Orientierung der Moleküle durch ein elektrisches Feld in der Größenordnung von 2kV/cm hervorgerufen , wobei um die Richtung des angelegten Feldes Rotationssymmetrie bezüglich des Brechungsindex herrscht . Läßt man linear polarisiertes Licht eine solche orientierte Lösung passieren , wobei die Polarisationsrichtung nicht mit einer der Hauptachsen des Brechungsindex zusammenfällt , wird es elliptisch polarisiert . Mittels eines Analysators wird diese Polarisationsänderung als Intensitätsänderung gemessen .

Das optische Verhalten der Lösung nach Abschalten des elektrischen Feldes wird durch Rotationsdiffusion bestimmt : durch Brownsche Molekularbewegung geht die Lösung allmählich vom geordneten wieder in einen Zustand über , in dem alle Ausrichtungen der Moleküle gleichverteilt sind . Die Schnelligkeit , mit der dieser Prozeß abläuft , wird durch die Rotationsdiffusionskoeffizienten bestimmt , die im wesentlichen von der Zähigkeit der Lösung und den Abmessungen des Moleküls abhängen . Durch die Induktion von Einzel- und Doppelstrangbrüchen wird die Konformation , und damit die dreidimensionale Struktur , der DNA-Moleküle geändert : das Plasmid geht von einer kompakten , verdrillten Form in eine ringförmige oder lineare Form über . Die Schnelligkeit der Relaxation des orientierten Zustands ist daher abhängig vom Anteil an geschädigter DNA . Die Relaxationszeiten von Plasmid-DNA von etwa 5000 Basenpaaren Länge liegen im Bereich von einigen hundert Mikrosekunden . Bei einer Meßdauer von 2 ms pro Relaxationskurve könnte man im Takt von einigen Millisekunden vom Zeitpunkt der Bestrahlung an die zeitliche Entwicklung des Schadens verfolgen . Falls die Änderungen in der Relaxationskurve empfindlich genug auf den jeweiligen Anteil an geschädigter DNA sind , ließe sich daraus etwas über die chemischen Vorgänge lernen , die zu Strangbrüchen führen . Voraussetzung dafür ist , daß die Bestrahlung innerhalb von wenigen μ s abgeschlossen ist . Dies wird in der GSI Darmstadt bei der schnellen Extraktion am Schwerionensynchrotron (SIS) möglich sein .

Im Hinblick auf spätere Anwendungen zur Untersuchung der Kinematik schwerionen-induzierter Schäden sollen zunächst an Proben mit manifestiertem Schaden die Möglichkeiten , die die Analyse von elektrooptischen Relaxationskurven bezüglich der Detektion von Strangbrüchen bietet , in dieser Arbeit näher untersucht werden . Insbesondere sollen Reproduzierbarkeit , Stabilität und Empfindlichkeit der Meßmethode geprüft werden . Referenzmessungen werden mit der Gel-Elektrophorese durchgeführt .

1. Physikalische Grundlagen

Die mathematische Beschreibung der Mechanismen bei elektrooptischen Messungen ist im allgemeinen Fall sehr komplex. Um die grundlegenden Ideen darzustellen, wird zunächst der Spezialfall eines Moleküls erläutert, das sich als starrer Zylinder beschreiben läßt. Dieser Spezialfall bildet auch bei Modellen für flexible Moleküle die Grundlage insofern, als einzelne Segmente als starrer Zylinder betrachtet werden.

1.1 Brechungsindex einer Lösung mit optisch anisotropen Molekülen

In einer Lösung mit optisch anisotropen Molekülen ist der Beitrag jedes Moleküls zur optischen Anisotropie der Lösung bestimmt durch seine Orientierung relativ zur Polarisationsrichtung des einfallenden linear polarisierten Lichtes. In einer Lösung, in der alle Molekülrichtungen gleich vertreten sind, ist kein Nettoeffekt zu sehen, da die Beiträge der einzelnen Moleküle sich im Mittel aufheben. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wird eine einheitliche Orientierung der Moleküle hervorgerufen, so daß sich die Beiträge addieren.

In einem typischen elektrooptischen Experiment wird das Licht senkrecht zum angelegten elektrischen Feld eingestrahlt, d.h. der elektrische Feldvektor des Lichtes und das angelegte Feld liegen in der Ebene senkrecht zur Einfallsrichtung. Die x-Achse sei durch das angelegte elektrische Feld definiert, die y-Achse durch die Richtung senkrecht zu x und zur Einfallsrichtung des Lichtes. Der Beitrag eines jeden Moleküls zur optischen Anisotropie der Lösung ist proportional zu $\alpha_{yy} - \alpha_{xx}$, wobei jeweils die Komponenten der optischen Polarisierbarkeit, die in Richtung der entsprechenden Achsen beitragen, gemeint sind. Diese hängen von der Orientierung des Moleküls relativ zum ortsfesten System ab. Die beiden Winkel, die diese Orientierung beschreiben, seien unter Ω zusammengefaßt. Die optische Anisotropie der Lösung ergibt sich aus der Integration über alle auftretenden Orientierungen Ω , gewichtet mit der Wahrscheinlichkeitsdichte $w(\Omega, t)$, mit der diese Orientierung auftritt:

$$\Delta\alpha(t) = \int_{\Omega} w(\Omega, t) * (\alpha_{yy}(\Omega) - \alpha_{xx}(\Omega)) d\Omega \quad (1)$$

Die Wahrscheinlichkeitsdichte $w(\Omega, t)$ gehorcht der Rotationsdiffusionsgleichung:

$$\frac{\partial w}{\partial t} = D_r R \left[R w + \frac{w}{kT} R U \right], \quad (2)$$

wobei $R = u \times \frac{\partial}{\partial u}$ und u der Einheitsvektor ist, der die Orientierung des Moleküls im ortsfesten System angibt. Der zweite Term der Klammer beschreibt die Wirkung einer externen Kraft, z.B. durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Er verschwindet, da hier nur der Fall der feldfreien Relaxation, also die Zeitabhängigkeit von $w(\Omega, t)$ nach Abschalten des elektrischen Feldes, betrachtet werden soll. Die Größe D_r ist der Rotationsdiffusionstensor. Die Prämisse, daß es sich um einen starren Rotator handelt, entspricht hier der Konstanz von D_r bezüglich der Zeit.

Mit der Greensfunktion $P(\Omega, t | \Omega_0)$ der Differentialgleichung mit der Randbedingung $P(\Omega, 0 | \Omega_0) = \delta(\Omega, \Omega_0)$ ergibt sich die zeitabhängige Wahrscheinlichkeitsdichte für den Prozeß nach Abschalten des Feldes zum Zeitpunkt t_0 aus der Verteilung zu diesem Zeitpunkt durch Integration über alle Orientierungen Ω_0

$$W(\Omega, t) = \int_{\Omega_0} P(\Omega, t | \Omega_0) W(\Omega_0) d\Omega_0$$

Die Differentialgleichung bezeichnet man als Smoluchowski-Gleichung. Eine ausführliche Behandlung findet sich in [WeDo78]. Bei der Behandlung eines starren Rotators läßt sich zeigen, daß $\Delta\alpha(t)$ sich als Summe von im allgemeinsten Fall fünf Exponentialfunktionen schreiben läßt, deren Zeitkonstanten nur von den Komponenten von D_r abhängen. Diese Zahl wird durch zusätzliche Symmetrien bezüglich der Hauptachsen der optischen Anisotropie und des Diffusionstensors reduziert. Die Mindestzahl beträgt zwei Komponenten, die der längsten und der kürzesten der ursprünglich fünf entsprechen. Für eine Lösung, die mehrere Arten von Molekülen enthält, wird die Relaxation des elektrooptischen Effektes durch eine Summe von Exponentialfunktionen beschrieben: für jede Sorte gibt es dann mindestens zwei Zeitkonstanten.

Die Koeffizienten der Exponentialfunktionen sind jeweils bestimmt durch einen Anteil, der durch den Orientierungsgrad der Lösung zu Beginn der Relaxation gegeben ist (Orientierungsfaktor), und einen Anteil, der die optische Polarisierbarkeit der Moleküle enthält. Diese Faktorisierung ist eine spezielle Eigenschaft des starren Rotators. Unter Vernachlässigung der Terme $o(E^2)$ und größer läßt sich die Zeitabhängigkeit der optischen Anisotropie schreiben als

$$\Delta\alpha(t) = (E^2 / 15) \sum O_i A_i \exp(-\lambda_i t)$$

O_i = Orientierungsfaktor (bestimmt durch Molekülorientierung z.Z. t_0)

A_i = Anisotropiefaktor (bestimmt durch die optische Polarisierbarkeit gemittelt über die Orientierungen Ω)

$\lambda_i = f(D_r)$

E = Feldstärke

1.1.1 Orientierungsfaktor

Der Orientierungsfaktor enthält die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Molekül-orientierungen zum Zeitpunkt t_0 . Diese ist durch die Boltzmann-Verteilung bestimmt :

$$W(\Omega_0) = N \exp(-V(\Omega_0)/kT)$$

$V(\Omega_0)$ ist die potentielle Energie eines Moleküls im elektrischen Feld unter der Orientierung Ω zum Zeitpunkt t_0 .

Mechanismus der Orientierung von Makromolekülen im elektrischen Feld

Es existieren im wesentlichen zwei Konzepte, die die Ausrichtung von Makromolekülen wie DNA im elektrischen Feld beschreiben: induziertes Dipolmoment in der Ionenhülle und gesättigtes Dipolmoment.

A) Die Dipolmomente, die für eine Ausrichtung der Moleküle sorgen, werden in der Ionenhülle, die das Molekül umgibt, erzeugt. Im feldfreien Zustand sind die Ionen der Pufferlösung in einem Gleichgewichtszustand nahe der örtlich festen Ionen des DNA-Rückgrats (Phosphatgruppen) lokalisiert. Bei Anlegen eines äußeren Feldes entfernen sich die beweglichen Ionen aus dieser Position. Die neue Gleichgewichtslage wird durch das lokale elektrische Feld bestimmt, also auch durch die Kräfte zwischen den Pufferionen. Eine kurze Zusammenstellung der Modelle für die Polarisierbarkeit der Ionenhülle findet sich in [EE81]. Für kleine Moleküle führt dieses Modell jedoch zu Diskrepanzen zwischen der Theorie und den Ergebnissen der Experimente. Andererseits läßt sich der Einfluß der Zusammensetzung der Pufferlösung auf den Orientierungsprozeß mit diesem Ansatz erklären.

B) Diekmann et al. [Detal82] schlugen das Modell des gesättigten Dipolmoments vor: Für kleine Feldstärken wird der Prozeß durch ein induziertes Dipolmoment beschrieben. Mit wachsender Feldstärke geht das Dipolmoment in einen Grenzwert p_s über. Die Übergangsregion E_m sowie die Feldstärke E_0 , von der an Sättigung eintritt, sind abhängig von der Größe der Moleküle. Die Energie im elektrischen Feld hat dann die Form

$$U = -\alpha_e E (E\theta + E_0(1-\theta))$$

wobei $\theta = 1 / (1 + \exp((E - E_0)/E_m))$ und α_e die elektrische Polarisierbarkeit ist. Das gesättigte Dipolmoment ist $p_s = \alpha_e E_0$. Für große Moleküle ist E_0 klein, so daß man sich bei den verwendeten Feldstärken in der Region des permanenten Dipolmomentes befindet. Dieser Ansatz stimmt mit den Daten aus Experimenten bei allen verwendeten Größen von Molekülen überein. Es handelt sich hierbei jedoch um einen rein empirischen Ansatz. Eine Theorie, die diesen Ansatz untermauert und alle aus den Messungen bestimmten Parameter (E_0 , E_m , gesättigtes Dipolmoment p_s) richtig berechnet, wurde noch nicht entwickelt.

1.2 Rotationsdiffusionskoeffizient

Die Berechnung der Rotationsdiffusionskoeffizienten aus den Abmessungen der Moleküle stellt ein schwieriges Problem dar. Schon beim starren Zylinder muß man für kleine Moleküle durch Zusatzterme Effekte durch die Enden der Moleküle berücksichtigen [YY80]. Für DNA-Moleküle im Bereich von 100-200 Basenpaaren (bp) ist das Modell eines Zylinders nach [Broe] anwendbar. Für größere Moleküle gibt es den Ansatz des leicht gekrümmten Zylinders sowie für etwas flexiblere Moleküle das Modell der "wormlike coil", die das Molekül als wurmähnlich gekrümmt, aber nach Mittelung über die internen Koordinaten als starr betrachtet [Hear62]. Der Formalismus beruht auf Modellen nach Kirkwood [KirI48], [Ki54] und wird auf seine Anwendbarkeit in [YAYA73] überprüft. Am anderen Ende des Spektrums gibt es Modelle für gänzlich flexible Moleküle. Dabei wird das Molekül in Segmente unterteilt, die sich je nach Modell mehr oder weniger unabhängig voneinander bewegen. Man versucht, das Maß an Flexibilität empirisch durch Abmessungen und Distanz der Segmente zu beschreiben. Meist führt man eine Größe ein, die man als Beharrungslänge P bezeichnet, und die ein Maß für die Flexibilität der Moleküle darstellt. Die Beharrungslänge gibt die mittlere Länge der Segmente an, die als starr betrachtet werden können. Der Grenzwert $P \rightarrow L$, wobei L die Länge des Moleküls ist, entspricht dem starren Rotator.

Ein numerischer Ansatz, in dem die auftretenden Konformationen durch Monte-Carlo-Simulation erhalten werden, ist in [HaZi81] beschrieben. Nach einer Mittelung über die für 100-200 Molekülformen numerisch bestimmten Relaxationszeiten werden die Ergebnisse als Quotient τ_B/τ in Abhängigkeit von $X = L/P$ aufgetragen. Dabei ist τ_B die nach der Theorie von Broersma für einen starren Zylinder berechnete Relaxationszeit. Der Quotient beschreibt also die Abweichung vom Verhalten eines starren Zylinders. Dieser Kurve wird ein Polynom dritten Grades in X angepaßt. Unter der Annahme, daß P von L unabhängig ist, läßt sich aus der Kenntnis der Relaxationszeit und der Länge des Moleküls die Beharrungslänge berechnen. Vergleiche mit experimentellen Daten finden sich in [Ha81].

All diesen Modellen ist gemeinsam, daß ausschließlich Aussagen über die längste Relaxationskonstante gemacht werden, wobei angenommen wird, daß die Rotation des Gesamtmoleküls, die mit dieser Konstante beschrieben werden soll, deutlich langsamer abläuft als alle sonstigen, internen Bewegungen. Weiterhin wird stets von einem kettenförmigen Molekül ausgegangen; Moleküle mit tertiärer Struktur, wie etwa die bei Messungen von Strangbrüchen gern verwendeten Plasmide, werden nicht beschrieben.

1.3 Brechungsindex und Phasendifferenz

Der Brechungsindex hängt mit der optischen Anisotropie über die Lorentz-Lorenzgleichung zusammen :

$$\frac{n_{\parallel}^2 - 1}{n_{\parallel}^2 + 1} = \frac{4\pi N}{3(4\pi\epsilon)} \alpha_{\parallel}$$

$$\frac{n_{\perp}^2 - 1}{n_{\perp}^2 + 1} = \frac{4\pi N}{3(4\pi\epsilon)} \alpha_{\perp}$$

N = Anzahl der Moleküle pro Volumeneinheit

α_{\parallel} , α_{\perp} Projektion der gemittelten optischen Polarisierbarkeit parallel und senkrecht zum angelegten Feld

Für kleine Differenzen $n_{\parallel} - n_{\perp}$ erhält man

$$n_{\parallel} - n_{\perp} = \frac{2\pi N}{9(4\pi\epsilon_0)} \frac{(n^2 + 2)^2}{n} (\alpha_{\parallel} - \alpha_{\perp})$$

$$n = (n_{\parallel} + 2n_{\perp}) / 3$$

Linear polarisiertes Licht, das senkrecht zum angelegten Feld eingestrahlt wird, hat nach Durchqueren der Lösung einen Phasenunterschied δ zwischen seiner senkrechten und seiner parallelen Komponente, so daß elliptische Polarisation auftritt. Der Phasenunterschied δ ist bei Licht der Wellenlänge λ_0 und einer durchlaufenen Schicht der Länge l gegeben durch

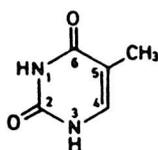
$$\delta = \frac{2\pi l (n_{\parallel} - n_{\perp})}{\lambda_0}$$

2. DNA-Moleküle und Strahlenwirkung

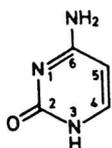
2.1 Aufbau der DNA

DNA-Moleküle sind Polymere aus Nukleotiden. Ein Nukleotid besteht aus einer Base-Pentose-Phosphatgruppe. Die im DNA-Molekül auftretenden Basen sind zyklische Basen der Pyrimidin- und der Purinreihe, nämlich Thymin und Cytosin sowie Adenin und Guanin.

Pyrimidin-Basen

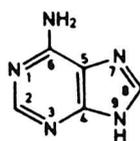


Thymin (T)

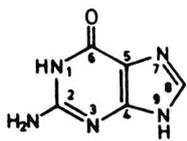


Cytosin (C)

Purin-Basen



Adenin (A)



Guanin (G)

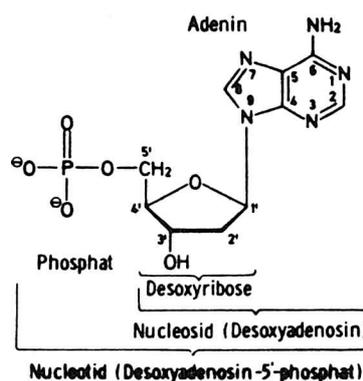


Abb.2.1 in DNA natürlich vorkommende Pyrimidin- (a,b) und Purinbasen (c,d) (entnommen: [Hoppe])

Das Rückgrat des Moleküls wird aus einer Zucker - Phosphat - Zucker - Kette gebildet. Es hat wegen der Phosphatreste sauren Charakter. So ergibt sich eine gute Wasserlöslichkeit. Die dreidimensionale Struktur der Moleküle wird durch intra- und intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Basen bestimmt. Die kovalente Bindung zwischen den einzelnen Nukleotiden erfolgt über Phosphordiesterbrücken zwischen den Hydroxylgruppen der Zucker.

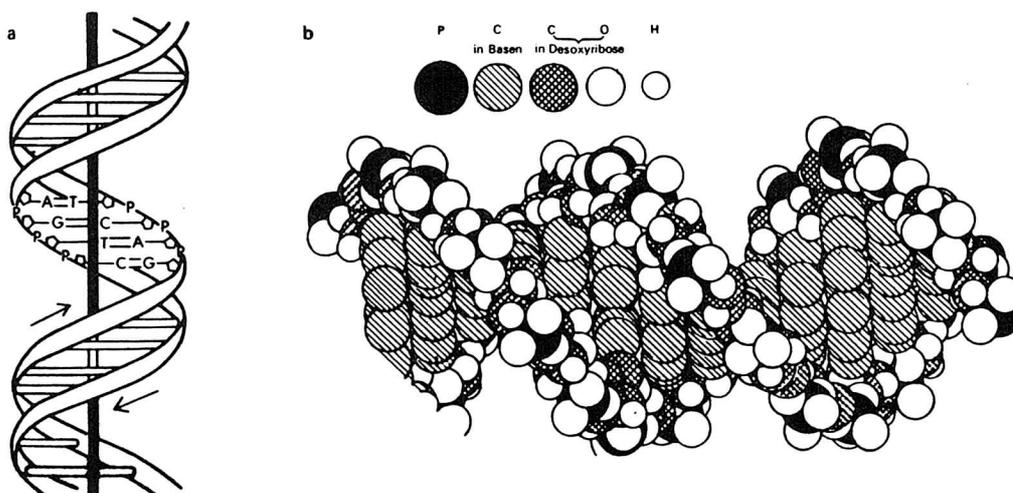


Abb 2.2 Helixstruktur der DNA mit Basenpaarung (entnommen [Hoppe])

- schematische Darstellung der kompletären Anordnung
- Kalottenmodell

Der Abstand zwischen zwei Basen beträgt etwa 0.34 nm . Eine Windung der Doppelhelix umfaßt 10 Basen , also 3.4 nm . Die Basen liegen im Innern der Doppelhelix und sind fast senkrecht zu den beiden Strängen angeordnet . Die Verbindung zwischen den beiden Strängen erfolgt über Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Basen der beiden Stränge .

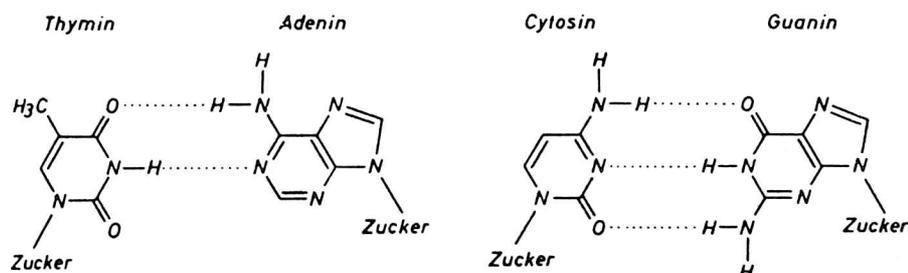


Abb. 2.3 : Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Basen [Lasko]

Adenin und Thymin können jeweils zwei Bindungen ausbilden , Guanin und Cytosin drei Bindungen . Ein Basenpaar wird immer aus der Kombination Pyrimidin-Purin gebildet , da eine Bindung mit der identischen Base zuviel oder zuwenig Platz in der Doppelhelix einnehmen würde . Somit wird durch die Reihenfolge der Basen eines Stranges die Sequenz auf dem komplementären Strang festgelegt . Diese Basenäquivalenz ermöglicht die Replikation der DNA-Moleküle .

Neben der Bindung horizontal zur Helixachse wird das DNA-Molekül durch vertikale Wechselwirkungen stabilisiert . Hierbei polarisiert die polare Bindung einer Base den Ring der benachbarten Base . Die Stabilität ist stark abhängig von Basenzusammensetzung , pH-Wert der Lösung , Salzkonzentration und Art des Lösungsmittels . DNA mit einem hohen Anteil an Guanin-Cytosin-Paaren ist stabiler als ein Molekül mit hohem Adenin-Thymidin-Anteil. Dafür sind die unterschiedlichen Dipolmomente der Basen verantwortlich : die Dipolmomente der A-T-Paare sind klein und gegeneinander gerichtet, so daß die Bindungsenergie verringert wird , während sie bei G-C-Paaren anziehend wirken .

Die optische Anisotropie der DNA-Moleküle wird durch die Polarisierbarkeit der aromatischen Ringe der Basen bestimmt . Die Orientierung der Moleküle im elektrischen Feld erfolgt über eine Polarisierung längs der Zucker-Phosphat-Kette . Da die Basen fast senkrecht zum Rückgrat angeordnet sind und im Mittel Rotationssymmetrie um diese Achse herrscht , verhält sich ein solches Molekül optisch wie ein einachsiger Kristall mit der optischen Achse in Richtung des orientierenden Feldes . Die permanenten Dipolmomente zwischen den Phosphat- und Zuckergruppen sind auf den beiden Strängen entgegengesetzt gerichtet , so daß das Molekül als Ganzes längs des Rückgrates kein permanentes Dipolmoment besitzt . Da sich große Moleküle bezüglich ihrer Orientierung verhalten , als besäßen sie ein permanentes Dipolmoment , stützt dies den Ansatz eines gesättigten Dipolmoments (siehe Kap.1) nach Diekmann et al. .

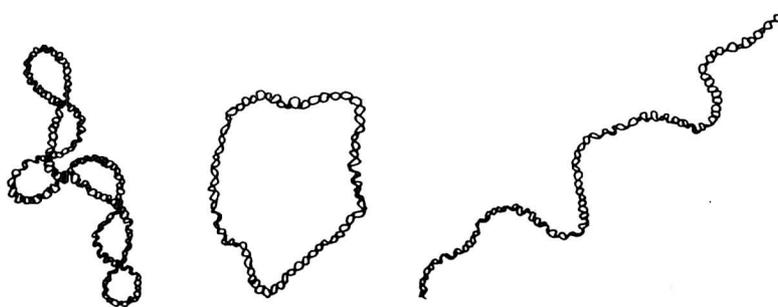
Abhängig von Salz- und Wassergehalt des Lösungsmittels liegt DNA in unterschiedlicher Konformation vor. Zelluläre DNA liegt meist in der sogenannten B-Form vor. Bei abnehmendem Wassergehalt kann sich diese in die A-Form umwandeln. Einen Vergleich der geometrischen Parameter zeigt Tabelle 2.1. Bei sehr hoher Salzkonzentration tritt die Z-Konformation auf. Diese ist im Unterschied zu den beiden anderen linkshelikal.

	A-Form	B-Form
Basenpaare/ Helixwindung	ca. 11	10.4-10.5
Abstand der Basenpaare	0.26 nm (± 0.04)	0.34 nm (± 0.04)
Winkel zwischen zwei Basenpaaren	$71^{\circ} - 77^{\circ}$	ca. 90°

Tab. 2.1 Vergleich zwischen A- und B-Form [Hoppe]

2.2 Plasmidstruktur

Plasmide sind unabhängige DNA-Anteile in Bakterien, die in der Wirtszelle mitrepliziert werden. Sie enthalten genetische Information z.B. für die Resistenz gegen Antibiotika. Bei den SV40 handelt es sich genau genommen nicht um ein Plasmid, sondern um virale DNA, die wie Plasmide ringförmig kovalent geschlossen ist. Plasmide sind ringförmig und zu einer Superhelix verdrillt. In der replikativen Form sind die Moleküle mehrfach verdrillt (supercoiled). Durch Aufbrechen einer der beiden Stränge wird die Spannung gelöst, unter der das Molekül steht, indem sich die Stränge entwinden. Die vorher sehr kompakte Form lockert stark auf und wird zu einem ringähnlichen Gebilde (nicked circle). Ein Doppelstrangbruch führt zur Auflösung der Ringstruktur (linear form).



ungeschädigt Einzel- Doppelstrangbruch

Abb.2.4 Konformationen kovalent geschlossener DNA (Plasmide)

Die superhelikale Struktur des SV40 (5300 bp) wurde durch stufenweises Entdrillen durch eine Chemikalie untersucht [KeWe] . Danach besteht die Superhelix aus 20-23 Windungen in einem Zustand , in dem die Superhelixachse in einer Ebene liegt . Die Anzahl der superhelikalen Windungen kompensiert gerade die Anzahl der wegen dieser tertiären Verdrillung wegfallenden helikalen Windungen .

2.3 Bestrahlung von biologischen Proben

An der GSI Darmstadt existiert neben der Möglichkeit der Schwerionenbestrahlung eine Einrichtung zur Röntgenbestrahlung . Die Unterschiede in den Dosis-Effekt-Kurven der beiden Strahlungsarten sind unter anderem Gegenstand der Untersuchung . Die Strahlungsarten unterscheiden sich vor allem hinsichtlich der räumlichen Verteilung der Energiedeposition in bestrahltem Material .

2.3.1 Röntgenstrahlung

Bei Röntgenstrahlung wird die Energie der Strahlung gleichmäßig über die gesamte Probe verteilt . Die Bahnen der durch Photo-Effekt und Compton-Effekt erzeugten Elektronen sind räumlich voneinander getrennte Ereignisse . Deshalb wird Röntgenstrahlung als *dünn ionisierend* bezeichnet . Die Primärstrahlung wird mit wachsender Eindringtiefe exponentiell geschwächt .

2.3.2 Schwere Ionen

Im Gegensatz zur dünn ionisierenden Strahlung wird bei Beschuß mit schweren Ionen die Energie lokal deponiert , wobei Bahnspuren mit hoher Ionisationsdichte entstehen . Schwere Ionen werden deshalb als *dicht ionisierend* bezeichnet . Jedes Ion hinterläßt im Material eine Bahnspur , bei der im Innern die Ionisationsdichte hoch ist und nach außen mit $1/r^2$ abfällt (Abb.2.4b) . Die absorbierte Dosis in Abhängigkeit von der Eindringtiefe zeigt Abb.2.4a . Biologisches Material verhält sich hinsichtlich der Energieabsorption wie Wasser .

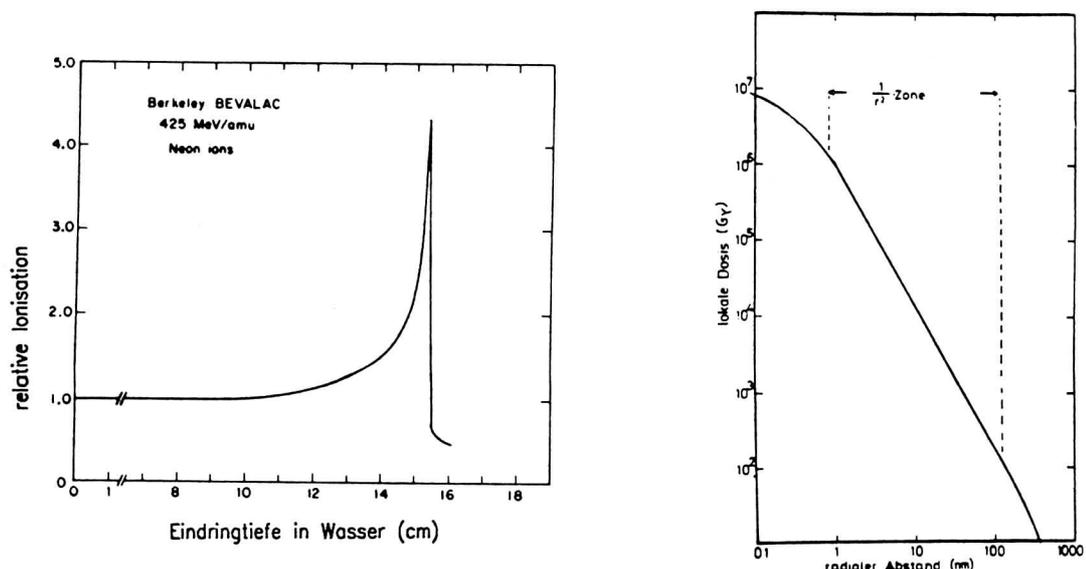


Abb.2.4 a) relative Ionisation
[Ngo]

b) radialer Abfall der Ionisationsdichte
[Chat]

2.3.3 Linearer Energietransfer LET

Um die Wirksamkeit von Strahlung in biologischem Material zu charakterisieren, wurde der LET eingeführt. Er beschreibt die pro Weglänge im Material absorbierte Energie. Berücksichtigt man alle erzeugte Elektronen, so entspricht der LET der vom Primärteilchen pro Wegstrecke abgegebenen Energie dE/dx . Der LET definiert nicht die Ionisationsdichte in der Teilchenspur. Da dies für die Effizienz der Bestrahlung von Bedeutung ist, beschreibt der LET nicht vollständig die biologische Wirksamkeit der Bestrahlung.

Ein in der Strahlenbiologie ebenfalls verwendeter Begriff ist der LET_{100} . Hierbei werden nur diejenigen Elektronen berücksichtigt, deren kinetische Energie weniger als 100 eV beträgt, man vernachlässigt also die höherenergetischen Elektronen. Der Bahndurchmesser, der durch dieses Abschneiden definiert wird, beträgt etwa 2nm bis 10nm.

2.4 Strahlenschäden

Die aus der Energieaufnahme resultierenden Schäden an DNA zerfallen in zwei Klassen: direkte und indirekte Wirkung.

Als Folge der direkten Ionisation eines Atoms am Rückgrat treten Deprotonation und Dissoziation auf, was meist zu Strangbrüchen führt. Schäden an Basen führen meist zu Basenverlust und nur in seltenen Fällen zu Strangbrüchen.

Für die indirekten Mechanismen als Folge der Radiolyse des Wassers sind für Strangbrüche, d.h. Deprotonation an der Zucker-Phosphat-Kette, hauptsächlich die OH-Radikale von Bedeutung. Neben der Produktionsrate bestimmt die Reichweite der Radikale im Lösungsmittel die Effizienz bei der Induktion von Schäden. Die Wirksamkeit der Strahlung in bezug auf Strangbrüche hängt exponentiell von der Fluenz Φ ab:

$$\text{Strangbrüche(\%)} = 100 \cdot (1 - \exp(-\sigma \Phi)) \quad (2.1)$$

Der Wirkungsquerschnitt σ ist von der Energie und Art der Strahlung abhängig ebenso wie von der Größe des DNA-Moleküls und dem verwendeten Puffer. Der Wirkungsquerschnitt für Doppelstrangbrüche ist in der Regel um ein bis zwei Größenordnungen geringer als für Einzelstrangbrüche. Doppelstrangbrüche werden entweder durch ein Teilchen induziert oder treten auf, wenn zwei Einzelstrangbrüche in weniger als 10 bp Abstand induziert werden. Der relative Anteil, mit dem direkte und indirekte Mechanismen beitragen, variieren ebenfalls mit der deponierten Energie. Der Anteil an direkten Schäden nimmt mit wachsendem LET zu. Bedingt durch den indirekten Anteil hängt die Wirksamkeit der Strahlung auch von der Zusammensetzung des Puffers ab.

3. Material und Methode

3.1 Biologische Proben

Es wurden vier verschiedene Plasmide untersucht. Die Plasmide unterscheiden sich in Größe und Basensequenz, wobei nur die Größe bei elektrooptischen Messungen eine Rolle spielt. PHW ist mit 5300 bp das größte hier verwendete Plasmid. SV40, isoliert aus einem Affenvirus, hat 5200 bp, PBR von E-coli Bakterien ist 4300 bp lang. PUC mit 2700 bp ist der kleinste Vertreter.

Die Plasmide werden in TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA) aufbewahrt. Bei 4 °C oder gefroren gelagert, sind die Plasmide lange verfügbar. Bei langem Stehen bei höherer Temperatur besteht die Gefahr, daß etwaig vorhandene Nukleasen wirksam werden und die Moleküle zerstören. Die elektrooptischen Messungen wurden entweder in diesem Puffer oder in sogenanntem EO-Puffer (0.1 mM MgCl₂, 0.5 mM TRIS) durchgeführt. Dieser Puffer erwies als besonders geeignet für elektrooptische Messungen. In diesem Puffer sind die DNA-Moleküle allerdings wesentlich instabiler. Die Nukleasen werden nur bei Vorhandensein von Mg²⁺ wirksam, so daß die Zugabe von MgCl₂ die Zerstörung beschleunigt. Zusätzlich ist durch die geringe TRIS-Konzentration die Pufferwirkung der Lösung geringer, so daß eher Schwankungen im pH-Wert auftreten, die die Moleküle ebenfalls destabilisieren. Nach einem Tag ist eine deutliche Zunahme der Strangbrüche festzustellen. Um von TE- auf EO-Puffer zu wechseln, wurde 6-8 h bei 4 °C dialysiert (Ionenaustausch durch eine semipermeable Membran).

Die DNA-Konzentration betrug, soweit nicht anders angemerkt, 20 µg/ml. Die Proben wurden bis zur Messung in Eppendorf-Gefäßen auf Eis gehalten.

3.2 Bestrahlung der Proben

3.2.1 Röntgen-Versuche

Die Röntgen-Bestrahlungen wurden mit einer 250 kV Röntgenröhre durchgeführt. Zur Filterung des kurzwelligen Anteils des Röntgenspektrums wurden 1 mm Kupfer und 1 mm Aluminium verwendet. Die Proben wurden in Eppendorf-Gefäßen bestrahlt, die in einer Plastikschiene auf Eis lagen. Die Proben einer Meßreihe wurde zu Anfang gemeinsam bestrahlt und dann gestaffelt entnommen, bis die letzte Probe die höchste Dosis akkumuliert hatte. Die applizierte Dosis ist auf etwa 1% genau bekannt. Die Bestrahlung erfolgte, bis auf eine Ausnahme, bereits im für die Messung vorgesehenen Puffer. Die Dosisleistung betrug 6 Gy/min. Dosis und Dosisleistung wurden mit einer Ionisationskammer bestimmt.

3.2.2 Bestrahlung am UNILAC

Soweit möglich, wurden auch Bestrahlungen am UNILAC der GSI Darmstadt durchgeführt, der Energien bis zu 20 MeV/u liefert.

Die Bestrahlung erfolgte hier in speziell gefertigten Kammern, die z.T. aus Plastik und z.T. aus mit Gold überzogenem Edelstahl bestehen. Die tiefsten Kammern haben eine Höhe von 300 µm, die niedrigsten 50 µm. Der Durchmesser beträgt einheitlich 2 cm. Die Kammern werden oben mit einer 12 mm starken Hostaphanfolie abgedeckt, die mit einem Gummi-

ring und einem weiteren Ring mittels Schrauben gespannt werden . Die Wahl der Kammern hängt von der Reichweite der verwendeten Ionen bei der jeweiligen Energie ab . Die Bestimmung der applizierten Dosis erfolgt bei den Schwerionenexperimenten durch Auszählen der pro cm^2 auftreffenden Ionen . Dafür wurden Glas- oder Cr^{39} - Plättchen bestrahlt , die von den Ionen hinterlassenen Spuren aufgeätzt und die Anzahl der Spuren pro cm^2 bestimmt . Die Dosis berechnet sich daraus zu

$$\text{Dosis(Gy)} = 1.6 * 10^{-9} * \text{LET(keV}/\mu\text{m}) * \Phi(\text{Teilchen}/\text{cm}^2) / \rho(\text{g}/\text{cm}^3) \quad (3.1)$$

Damit die so berechnete Dosis stimmt , muß der LET über die betrachtete Strecke annähernd konstant sein . Für die bei GSI mit dem UNILAC erreichbaren Energien befindet man sich bei den biologischen Bestrahlungen in der Regel in der Region des Bragg-Peaks. Bei Ionen mit geringer Energie , wie 4.5 MeV Argon-Ionen , liegt u.U. auch der Bereich jenseits des Bragg-Maximums innerhalb der Probe , so daß der LET stark variiert . Die Reichweite von 4.5 MeV/u Argon beträgt in Wasser etwa $80\mu\text{m}$. Dies bedeutet , daß der LET bei der Verwendung von $100\mu\text{m}$ hohen Kammern vom Eintritt in die Lösung bis zum Erreichen des Kammerbodens von anfänglich $1800\text{keV}/\mu\text{m}$ bis 0 abfiele . In diesem Falle ist zwar die insgesamt in der Probe deponierte Energie bekannt , da die Ionen in der Probe gestoppt wurden ; innerhalb der Probe ist jedoch die Energiedeposition stark inhomogen . Bedingt durch die Methode zur Bestimmung der Fluenz sowie durch die LET-Verschmierung ist die nach 3.1 berechnete Dosis im allgemeinen nur auf 30% genau .

Bei den Experimenten mit geringer Reichweite muß also auf dünnere Kammern ausgewichen werden . Um dennoch die für die elektrooptischen Messungen benötigte Mindestmenge von $80\mu\text{l}$ DNA-Lösung zu erhalten , müssen für jede Dosis 2-3 Kammern bestrahlt werden oder die Konzentration der Lösung 2-3 fach gewählt werden . In letzterem Fall muß jede Probe nach der Bestrahlung einzeln verdünnt werden , wobei die Konzentration von Probe zu Probe etwas schwanken kann .

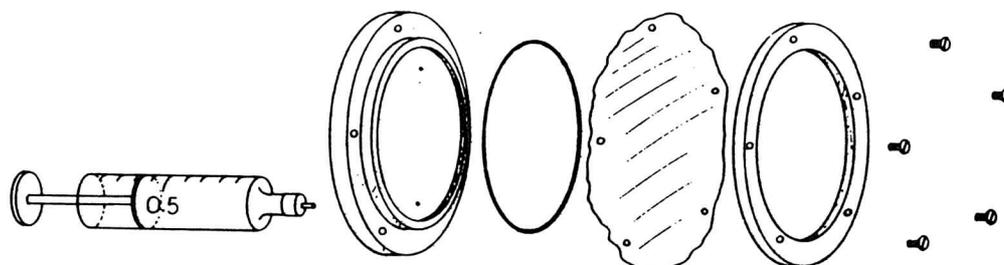


Bild 3.2 : Bestrahlungskammern für Bestrahlung am UNILAC

Die Kammern werden von hinten mit einer feinen Spritze gefüllt . Um den bestrahlten Inhalt zu entnehmen , kann man entweder die Kammern ausdrücken oder die Folie abziehen und den Tropfen mit einer Eppendorf-Pipette absaugen . In jedem Falle verliert man mindestens 10 μ l , oft jedoch mehr . Bei der gesamten Prozedur wurde darauf geachtet , die Plasmide sowenig Scherkräften wie nur möglich auszusetzen , um nicht zusätzliche Strangbrüche zu induzieren .

Wenngleich die Bedingungen , unter denen die Bestrahlung durchgeführt wurde , von Experiment zu Experiment variierten (Dialysedauer,Wartezeiten etc.) , so waren sie innerhalb einer Meßreihe für alle Proben in etwa gleich.

3.3 Referenzmessung : Gel-Elektrophorese

Die Standardmethode zur Strangbruch-Analyse ist die Gel-Elektrophorese . Die DNA-Lösung wird in die Taschen eines 1%igen Agarosegels gefüllt . Um die Lösung beim Laden des Gels besser sichtbar zu machen , wird sie mit Bromphenolblau gemischt . In einem Elektrophoresepuffer wird das Gel 12 h einer Spannung von etwa 20 V ausgesetzt . Die Wanderungsgeschwindigkeit in diesem Feld ist umgekehrt proportional zur Größe der Moleküle , bzw. bei gleicher Größe zur Konformation , so daß die vorkommenden Konformationen (linear , ringförmig , verdrillt) nach genügend langer Zeit deutlich voneinander getrennt sind . Der genaue funktionale Zusammenhang zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Größe hängt von der Konformation ab . Das Gel wird dann in Ethidiumbromid angefärbt , wobei dieser Fluoreszenzfarbstoff in erster Linie von den DNA-Molekülen eingebaut wird . Die Fluoreszenz in UV-Licht wird photographiert . Die Intensität des Fluoreszenzlichtes ist proportional zur DNA-Menge an dieser Stelle . Die so erhaltenen Negative werden mit einer CCD-Kamera digitalisiert . Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Programms , das die Intensität der Banden entlang der Laufstrecke projiziert . Bei stark unterschiedlichen Beiträgen der verschiedenen Konformationen sind manche Banden zu schwach zu sehen , während andere schon jenseits der Sättigungsgrenze sind . Dies zusammen mit etwaig vorhandenem Untergrund durch das Gel begrenzt die Genauigkeit dieser Methode auf etwa 10% .

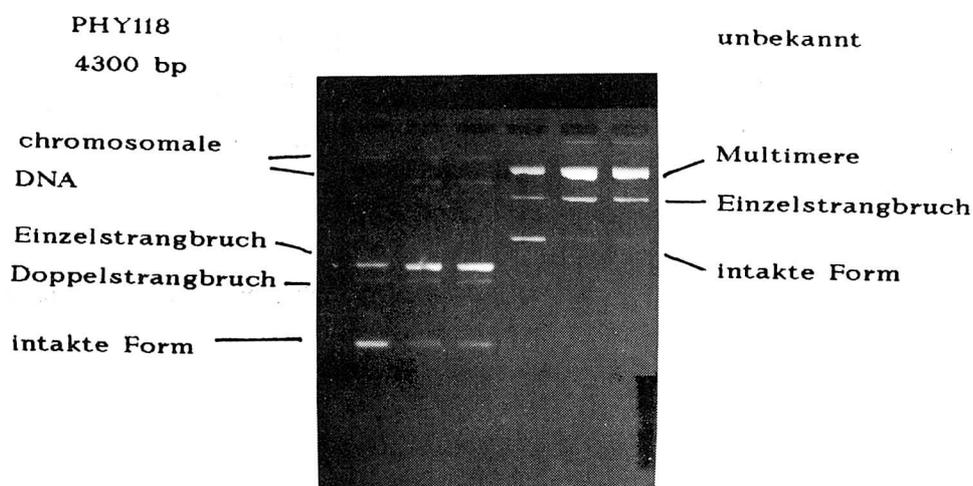


Abb.3.3 Elektrophorese-Gel

3.4 Aufbau der Apparatur

3.4.1 Optischer Aufbau

Ein 1.5 mW He-Ne-Laser liefert linear polarisiertes Licht mit einem Polarisationsgrad von 99.5%. Der Laser (Herstellerfirma Uniphase , Typ 1103P) zeichnet sich durch stabile Polarisation und geringes Rauschen aus .

Die Zelle besteht aus einem kleinen Glasblock , an dem seitlich Glasfenster angeklebt sind . Die Maße der Zelle sind $3 \times 4 \times 10 \text{ mm}^3$. Die Elektroden bestehen aus zwei dünnen Goldstreifen ,die innen befestigt sind . Das kleine Volumen der Zelle mit der Möglichkeit , Elektroden innen zu befestigen , machte es notwendig , die Zellen anfertigen zu lassen . Sowohl die Zelle als auch die Elektroden müssen gegenüber der Lösung chemisch inert sein . Die Eintrittsfenster der Zelle dürfen keinen Einfluß auf die Polarisation des Laserlichtes haben .

Da der Querschnitt der Zelle nur 12 mm^2 beträgt und der Laserstrahl nicht zu knapp unter der Oberfläche verlaufen darf , muß sorgfältig justiert werden , um möglichst wenig Aufstreuung und Reflexion zu verursachen . Daher wurde die Zelle auf einem optischen Tisch montiert , der in zwei Richtungen gekippt und um die Vertikale gedreht werden kann . Auch Höhe und Position senkrecht zum Laserstrahl können justiert werden . Die Photodiode muß ebenfalls in beiden Richtungen zum Strahl justierbar sein , da der Laserstrahl nach Durchgang durch alle optischen Komponenten aufgrund von Brechung seine Richtung leicht geändert hat.

Da im Hinblick auf künftige Messungen direkt am Bestrahlungsplatz ein möglichst kompakter Aufbau notwendig ist , wurden die Komponenten für den optischen Aufbau aus der Serie 40 der Firma OWIS verwendet , einem System optomechanischer Bauteile mit 40 mm Kantenlänge . Die kommerziell verfügbaren Elemente wurden durch speziell angefertigte Adapter ergänzt . Der gesamte Aufbau ist etwa 50 cm lang und 15 cm hoch .

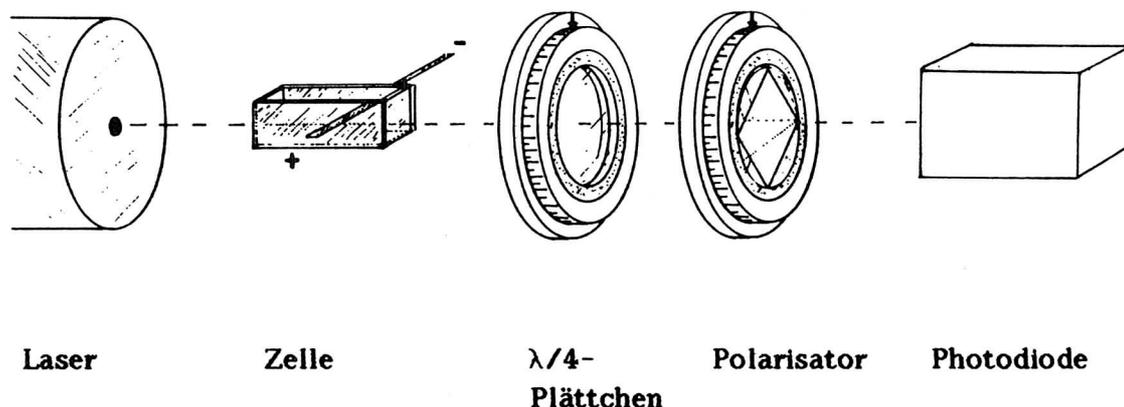


Abb 3.4 : Skizze des optischen Aufbaus

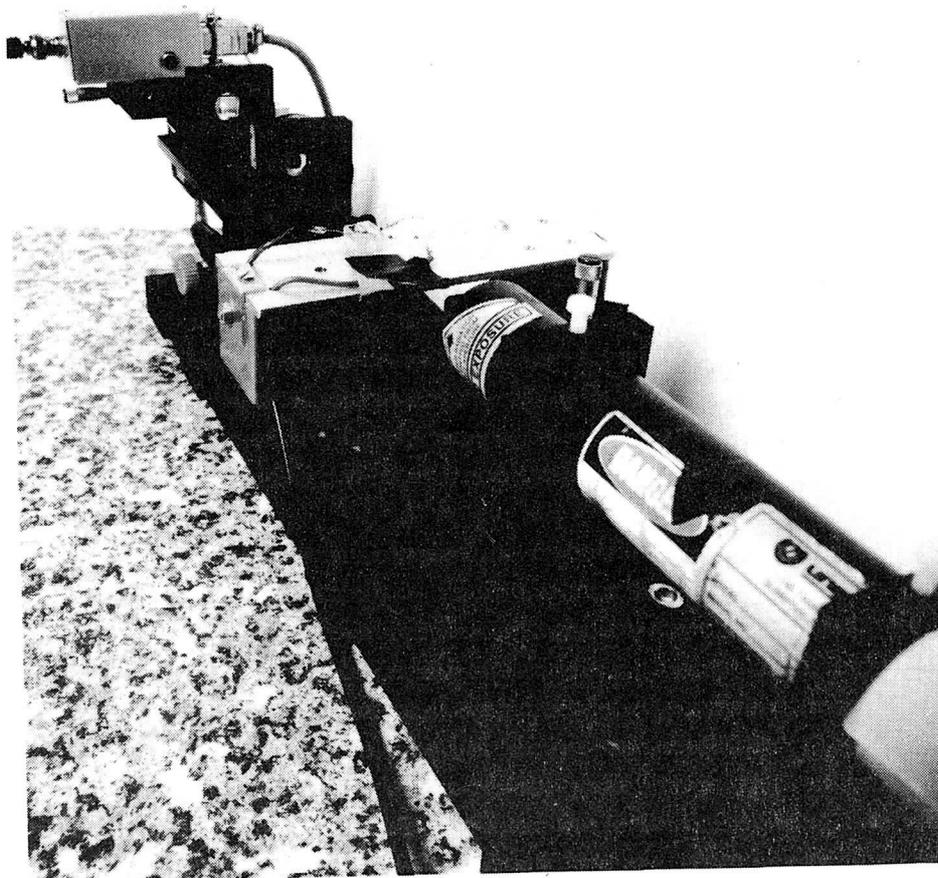


Abb.3.4b Optische Bank , Breite der Reiter : 4cm

Der Nachweis der elliptischen Polarisation erfolgt durch ein $\lambda/4$ -Plättchen , gefolgt von einem polarisierenden Würfel (Glan-Thompson-Polarisator) . Die gesamte Transmission der optischen Komponenten beträgt etwa 60% , wobei der Hauptanteil in der Zelle absorbiert wird . Die Zelle selbst , ohne angelegtes Feld , dreht die Polarisationsrichtung des Laserlichtes um weniger als 1° . Auf Linsen wurde verzichtet , da keine erkennbare Verbesserung durch ihre Verwendung festgestellt werden konnte . Die Intensität des transmittierten Lichtes nach Passieren des optischen Aufbaus ist durch folgenden Ausdruck gegeben :

$$I = -\frac{I_0}{4} * \sin 2\varphi \sin 2(\alpha - \lambda) \delta$$

- φ = Winkel der Polarisationsrichtung des eingestrahlten , linear polarisierten Lichtes zur Hauptachse des doppelbrechenden Systems (x-Achse)
- α = Winkel der Durchlaßrichtung des Analysators
- λ = Winkel der langsamen Achse des $\lambda/4$ -Plättchens
- δ = in der Zelle induzierter Phasenunterschied

Da der Phasenunterschied kleiner als 5° ist, kann der Sinus durch den Winkel und der Cosinus durch 1 genähert werden. Die optimale Einstellung der Polarisationsrichtung ist $\varphi = 45^\circ$. Die Orientierung des Analysators wird durch die Forderung nach minimalem Untergrund bestimmt: gekreuzt zur Polarisationsrichtung, also $\alpha = 135^\circ$. Für das $\lambda/4$ -Plättchen folgt dann eine optimale Einstellung von $\lambda = 45^\circ, 135^\circ$, die sich nur durch ein Vorzeichen unterscheiden. Durch das $\lambda/4$ -Plättchen wird also das elliptisch polarisierte Licht, dessen Hauptachse bei einer Einstellung von $\varphi = 45^\circ$ ebenfalls unter diesem Winkel zu finden ist, in linear polarisiertes Licht umgewandelt, dessen Polarisationsvektor in Durchlaßrichtung des Analysators zeigt. Falls der Polarisationsvektor um einen kleinen Winkel Δ gegen 45° verdreht ist, so ist die Ellipse in erster Näherung um $\Delta \cos \delta$ gegen 45° verdreht. Die optimale, gekreuzte Einstellung des Analysators wird damit zeitabhängig. Da δ jedoch klein ist ($< 4^\circ$), ist eine Genauigkeit von 1° in der Einstellung der Winkel α, φ ausreichend.

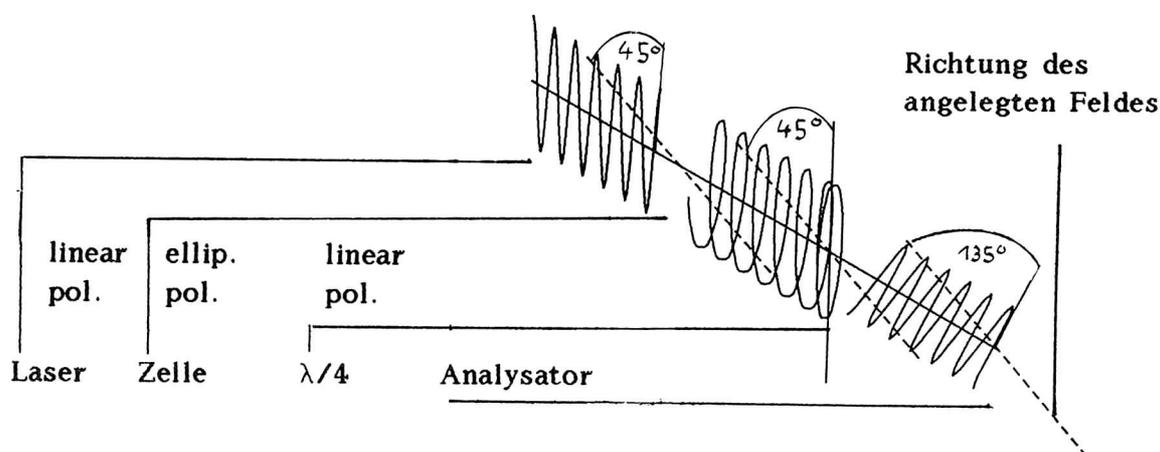


Abb.4.4 Schematische Darstellung der Polarisationsänderung

Da der Phasenunterschied gering genug ist, um die obige Näherung anwenden zu können, entspricht der exponentielle Abfall der gemessenen Intensität der zeitlichen Entwicklung der Brechungsindexes. Andernfalls wäre die Zeitabhängigkeit der Intensität durch die Funktionen $\sin \delta(t)$ und $\cos \delta(t)$ gegeben und somit keine einfache Analyse möglich. Falls die Winkel nicht genau den Optimalwerten entsprechen, ist die einzige Konsequenz eine etwas geringere Amplitude.

Die Messungen erfolgten in einem abgedunkelten Raum, da trotz Interferenzfilters Störungen durch das Raumlicht auftraten. Die optische Bank wurde auf einer Granitplatte aufgebaut, da die Messung sehr empfindlich auf Vibrationen reagiert.

3.4.2 Elektronischer Aufbau

Der Intensitätsverlauf wurde mit einer Photodiode (Typ EG&G SGD100A 8414) gemessen. Die Verstärkung erfolgte mit einem GSI-gefertigten Verstärker. Die Anforderung an den Verstärker war eine Bandbreite von 50Hz-500kHz. Der Verstärker wurde wegen des hohen Ausgangswiderstands der Diode (M Ω) direkt hinter die Diode gesetzt. Der Ausgangswiderstand des Verstärkers betrug 50 Ω . Als Spannungsquelle für die Kerr-Zelle wurde ein Hochspannungs-

pulser (Cober 605) verwendet. Hier war die Anforderung, Beginn, Dauer und Höhe des Pulses bestimmen zu können. Die Amplitude des Pulses war zwischen 0V und 2000V regelbar. Die Steuerung des Beginns und der Dauer erfolgte über ein externes Signal. Die Pulslänge war zwischen 1µs und 1s wählbar. Die Abfallszeit des Spannungspulses liegt bei diesem Modell unter 100ns. Der Ausgangspuls ging über ein 50Ω-Kabel an die Kerr-Zelle. Die Zeitkonstante des RC-Gliedes, bestehend aus der Kapazität der Zelle und einem parallelgeschalteten Entladewiderstand (200Ω), liegt ebenfalls unter 100 ns. Das Signal wurde mit einem Speicheroszilloskop aufgenommen. Die Triggung des Speicheroszilloskops erfolgte mit dem gleichen Signal, das das Steuersignal für den Hochspannungspulser der Zelle startete. Das Startsignal wurde manuell gegeben. Zwischen den Pulsen lagen etwa 5 s, so daß keine übermäßige Aufheizung der Probe auftrat. Die Auslese des Speicheroszilloskops und Zwischenspeicherung der Daten erfolgte über einen Rechner, von dem aus die Daten direkt auf den IBM-Großrechner der GSI übertragen werden konnten.

In der zuletzt verwendeten Version für die Datenaufnahme standen eine Zeitauflösung von 4096 Kanälen und eine Amplitudenauflösung von 10 bit zur Verfügung. Dies bedeutet bei 2 ms Gesamtaufnahmezeit eine Auflösung von 0.5 µs/Kanal. Die Zeitauflösung von 0.5 µs/Kanal ist nicht unbedingt erforderlich. Um den Einfluß einer geringeren Zeitauflösung zu untersuchen, wurde bei den gemessenen Kurven die Auflösung nachträglich verringert, indem Meßpunkte ausgelassen wurden, und die erhaltenen Kurven analysiert. Eine Abhängigkeit der Ergebnisse der Anpassung von der Zeitauflösung im Bereich von 0.5 µs bis 4µs / Kanal konnte nicht gefunden werden. Die später diskutierten Messungen wurden mit dem oben genannten System aufgenommen.

Um das Detektorsystem auf Schnelligkeit hin zu überprüfen, wurde das elektrooptische Signal von Nitrobenzol gemessen. Die Zeitkonstante des Systems betrug 3µs. Mit einer anderen Diode, die jedoch nicht genug Verstärkung für eine weitere Verwendung lieferte, wurde eine Zeitkonstante von 0.3µs gemessen; der limitierende Faktor ist also tatsächlich das Detektorsystem. Den Einfluß, den die Detektorabfallszeit auf die gemessene Funktion hat, erhält man durch Faltung der Ursprungsfunktion mit der Detektorfunktion:

$$G(t) = \int_0^t r(t-\tau) * F(\tau) d\tau$$

$G(t)$ = gemessene Funktion

$r(t)$ = Antwortfunktion (= $\exp(-t/\tau_d) / \tau_d$)

$F(t)$ = Ursprungsfunktion

Für eine Summe aus drei Exponentialfunktionen als Ursprungsfunktion erhält man als gemessene Funktion $G(t)$:

$$G(t) = \sum_{i=1}^3 a_i \left(\exp(-t/\tau_i) + \frac{\tau_d}{\tau_i - \tau_d} (\exp(-t/\tau_d) - \exp(-t/\tau_i)) \right)$$

τ_d = Detektorsabfallszeit 3µs

Der Korrekturterm ist für die hier gemessenen Relaxationszeiten (typischerweise $20 \mu\text{s}$, $100 \mu\text{s}$, $300 \mu\text{s}$) und angesichts des Signal-zu-Rauschverhältnisses zu vernachlässigen . Zur Kontrolle wurde eine $G(t)$ entsprechende Kurve berechnet und mit einer nach $F(t)$ bestimmten Funktion verglichen . Der Unterschied war schon ohne jedes Rauschen sehr gering .

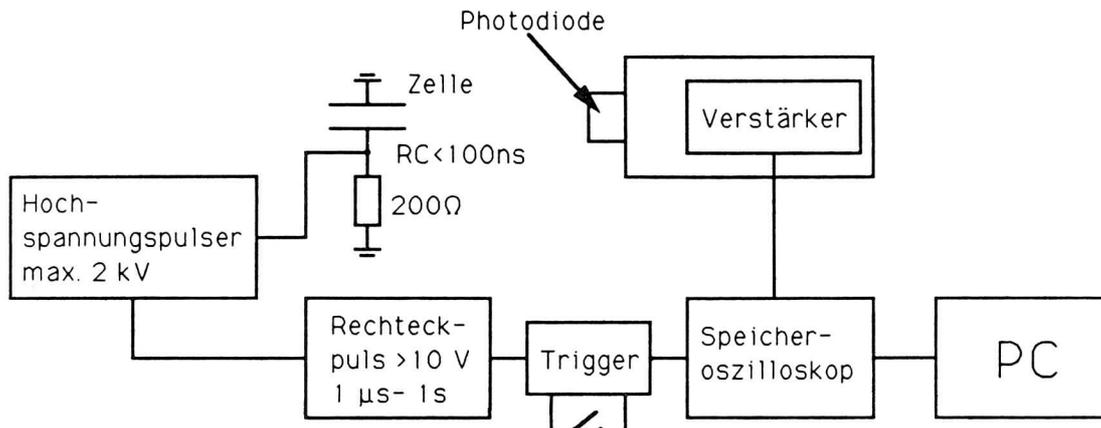


Abb.3.5 : Blockschaltbild der elektronischen Elemente

3.5 Durchführung der Messungen

Die Proben wurden mit Eppendorf-Pipetten in die Zelle gefüllt . Nach dem Füllen mußte die Zelle wegen Brechung in der Flüssigkeit justiert werden . Da bei den optischen Komponenten die Ablesegenauigkeit der Einstellung nur etwa 1° betrug , wurde die optimale Einstellung durch Maximieren der Signalhöhe bestimmt . Dazu wurde zunächst der Analysator bei gefüllter Zelle auf minimalen Durchlaß gestellt , das $\lambda/4$ -Plättchen auf Maximum . Diese Einstellung erfolgte mit dem Auge . Bei laufendem Trigger wurde dann die Einstellung etwas verdreht und die Höhe des Signals auf dem Oszilloskop beobachtet . Die Einstellung mit maximaler Signalhöhe wurde als Arbeitseinstellung gewählt . Dies wurde für jedes Plasmid wiederholt und auch bei Beginn eines neuen Experimentes . Innerhalb einer Meßreihe wurde die Einstellung beibehalten .

Von jeder Probe wurden in der Regel 4-8 Messungen gemacht . In einem früheren Experiment zeigten sich bei den Banden eines Elektrophorese -Gels , das mit den Proben aus der Zelle hergestellt wurde , Spuren eines Plasmids , das in der Messung vorher verwendet worden war . Daher wurde nach jeder Messung die Zelle mit destilliertem Wasser gespült und mit Luft oder Stickstoff getrocknet .

Bedingt durch das vorhandene Ausleseprogramm wurden die Kurven in Quartetts aufgenommen : je vier wurden im Oszilloskop gespeichert und nacheinander im Block ausgelesen . Pro Quartett dauerte das etwa 10 min . Trotz dieser etwas langen Prozedur ließ sich keine Zeitabhängigkeit der Ergebnisse feststellen , obwohl gelegentlich etwa $5 \mu\text{l}$ DNA-Lösung nachgefüllt werden mußten , weil ein Teil der Probe verdunstet war . Die Zellen waren

nicht mit Deckel versehen , weil sie für ein schnelleres Aufnahmesystem konzipiert worden waren , das wegen anderer Nachteile aber aufgegeben wurde . Die Zugabe von 5 μ l erhöht die Gesamtkonzentration von 20 μ g/ml auf 22 μ g/ml .

Bei Messungen mit bestrahlten Proben wurde zum Vergleich eine Gel-Elektrophorese durchgeführt , die meist nach der elektrooptischen Messung gestartet wurde .

3.6 Datenaufnahme und Analyse

Die aus dem Speicheroszillogoskop ausgelesenen Daten wurden zunächst auf dem Rechner zwischengespeichert . Die eigentliche Analyse erfolgt nach Übertragung auf den IBM-Großrechner . Mit dem von uns verwendeten Rechner ist es möglich , die Daten direkt nach der Messung zur Analyse auf den IBM-Rechner zu senden , da gleichzeitig mit der Verwendung als Auslesesystem eine Verbindung zum Großrechner besteht . Während dort das Analyseprogramm läuft , kann die nächste Messung durchgeführt werden . Die Ergebnisse der Analyse werden in einer Form abgespeichert , die eine schnelle graphische Darstellung der Parameter erlaubt : in Form von Spektren mit der Probennummer als Kanalnummer und dem Wert des Parameters als Kanalinhalt . Die Analyse der Kurven läßt sich stark automatisieren , indem ein Programm die Daten einliest und die Anpassungsroutine aufruft , die nach einem vorgegebenen Schema die Analyse durchführt . Kritische Punkte dabei sind die Bestimmung des Beginns des exponentiellen Abfalls und eine Überprüfung der Konvergenz . Der Beginn des Abfalls wird durch Aufsuchen des maximalen Kanalinhaltens vom Ende der Kurve her bestimmt. Sofern der Beginn scharf definiert ist , erwies sich diese Methode als tauglich .

Es traten immer wieder Kurven auf , für die die Analyseroutine innerhalb des vorgegebenen Schemas nicht konvergierte . Die Fehler , die die Routine für die Genauigkeit der gefundenen Parameter angibt , sind in diesem Falle null . Indem also der Fehler einer der Parameter für jede Kurve in einen Datensatz eingelesen wird , der sich graphisch darstellen läßt , lassen sich diese Kurven leicht finden .

Die einfache Struktur der Daten erlaubt es also , schon kurze Zeit nach der Messung festzustellen , ob die Ergebnisse verwertbar sind oder etwa aufgrund von starken Variationen noch mehr Kurven aufgenommen werden müssen . Die Nützlichkeit dieser direkten Kontrollmöglichkeit hängt von der Schnelligkeit ab , mit der die Analyseroutine vom Großrechner durchgeführt werden kann .

4. Ergebnisse

Eine typische elektrooptische Messung zeigt Abb.4.1. Die steilere Kurve ist die Messung einer unbestrahlten Probe PHW. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis beträgt 50:1. Das Rauschen trägt eine zusätzliche, gröbere Struktur. Bei Beginn des orientierenden Pulses steigt das Signal schnell an, bis es in einen Plateaubereich kommt, in dem Sättigung bezüglich der Orientierung erreicht ist. Nach Ende des Pulses relaxiert das elektrooptische Signal exponentiell.

Ziel ist es, eine Funktion zu finden, die die gemessenen Kurven beschreibt und Parameter enthält, die in geeigneter Weise die Änderung des exponentiellen Abfalls durch erhöhte Anteile an Strangbrüchen angeben. Drei Exponentialterme erwiesen sich als minimal mögliche Anzahl, um den Kurvenverlauf zu beschreiben.

Die Zahl der Abfallszeiten, die tatsächlich zur beobachteten Kurve beitragen, ist zu groß, als daß man sie im einzelnen auflösen könnte. Die tatsächliche Form, in der die Moleküle der beiden Konformationen (supercoiled, nicked circle) vorliegen, ist vielfältig. Macht man sich klar, daß das Molekül in der linearen Form 1700 nm lang, aber nur 2 nm dick ist, kann man sich die Vielzahl der Formen vorstellen, die innerhalb der durch die Konformation vorgegebenen Struktur möglich sind. Jede dieser Formen hat einen eigenen Satz von Rotationsdiffusionskoeffizienten. Hinzu kommen die Anteile, die von der Rotation von Segmenten und Segmentgruppen stammen.

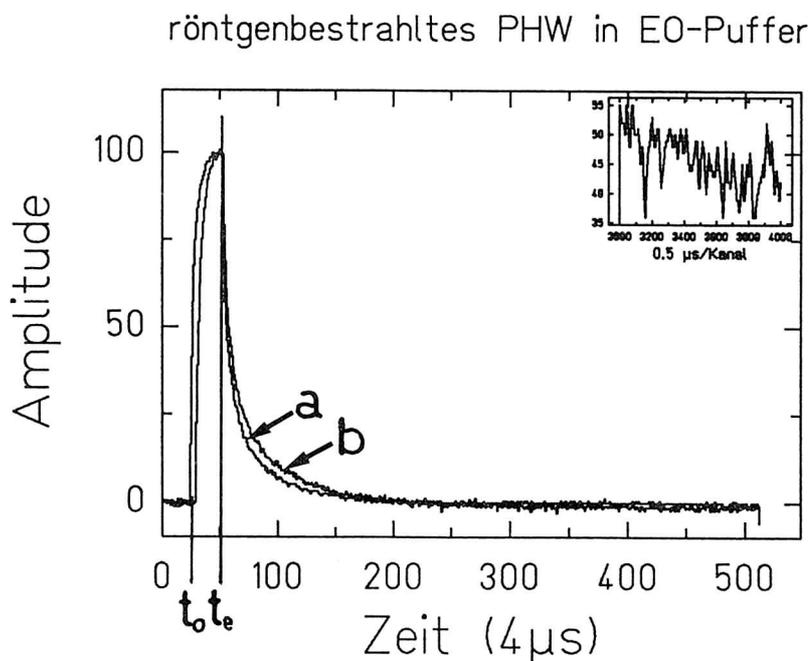


Abb.4.1 elektrooptische Messung des Pasmids PHW

t_o Beginn, t_e Ende des orientierenden Pulses

a) 20% Einzelstrangbrüche (unbestrahlte Kontrollprobe)

b) 80% Einzelstrangbrüche

Jede Konformation hat also ein ganzes Spektrum von Relaxationszeiten, wobei sich die Konformationen in den Beiträgen, die sie zu den einzelnen Relaxationszeiten liefern, unterscheiden. Insbesondere können die längsten auftretenden Relaxationszeiten nur von den stark aufgelockerten Molekülen mit Strangbruch stammen.

Die Abfallszeiten, die durch eine Anpassung von drei Exponentialfunktionen an die Meßkurve geliefert werden, sind also jeweils aus mehreren Beiträgen zusammengesetzt. Jede berechnete Abfallszeit repräsentiert eine Gruppe von Rotationsbewegungen. Durch Verschieben des Anteils der einzelnen Konformationen verschieben sich die relativen Beiträge der Konformationen zu den Relaxationszeiten. Damit wird auch die Zusammensetzung der drei Gruppen geändert, so daß im allgemeinen durch Bestrahlung nicht nur die Werte der angepaßten Amplituden sondern auch die der Abfallszeiten geändert werden. Insbesondere wird die angepaßte längste Abfallszeit durch einen erhöhten Anteil an Strangbrüchen größer, da die langen Abfallszeiten der ringförmigen Konformation einen größeren Anteil an der Gruppe von Relaxationszeiten haben, die durch die Anpassung zu einer Abfallszeit zusammengefaßt werden.

Die Unterschiede in den Diffusionskonstanten für ungeschädigte Moleküle und DNA mit Einzelstrangbruch sind bedingt durch Längenunterschiede und das unterschiedliche Verhältnis von Länge zu Breite der Konformation (Abb.4.2). Der Längenunterschied ist nicht sehr groß, geht aber in die Berechnung des Diffusionskoeffizienten stärker ein. Doppelstrangbrüche sollen nicht betrachtet werden, da bei den Bestrahlungen versucht wurde, sowenig Doppelstrangbrüche wie möglich zu erzeugen. Eine zusätzliche Konformation erhöht die Zahl der beitragenden Relaxationszeiten und macht eine Unterscheidung fast unmöglich.

Am Beispiel von Messungen an PHW in EO-Puffer sollen die Möglichkeiten und Schwierigkeiten der Analyse ausführlich diskutiert werden. Die Ergebnisse der übrigen Messungen werden kurz zusammengefaßt.

4.1 Messungen am Plasmid PHW (Argon 4.5MeV/u, Röntgen)

Das Plasmid PHW zeichnet sich durch ein günstiges Verhältnis zwischen dem Wirkungsquerschnitt für Einzelstrangbrüche (SSB) und für Doppelstrangbrüche (DSB) in EO-Puffer aus ($\sigma_{ssb}:\sigma_{dsb}=60$ bei Röntgenstrahlung). Bei den Bestrahlungen läßt sich der Anteil an Einzelstrangbrüchen auf 80% erhöhen, ohne daß ein nennenswerter Anteil an Doppelstrangbrüchen hinzukommt. Abb. 4.2 zeigt das Ergebnis der Gel-Elektrophorese für Röntgenbestrahlung und eine Bestrahlung mit 4.5 MeV/u Argon. Die Fehler in der Bestimmung des Anteils an Strangbrüchen mittels Gel-Elektrophorese sind bei vergleichbarem Anteil der Konformationen etwa 1/10. Bei sehr verschiedenen Anteilen ist er größer, da der Bereich, indem die Intensität des Fluoreszenzlichtes linear zur Menge an DNA im Gel ist, eng begrenzt ist. Der Anteil an Einzelstrangbrüchen, der bei den elektrooptischen Messungen die Vergleichsgrundlage bilden, sind die Ergebnisse der Gel-Elektrophorese.

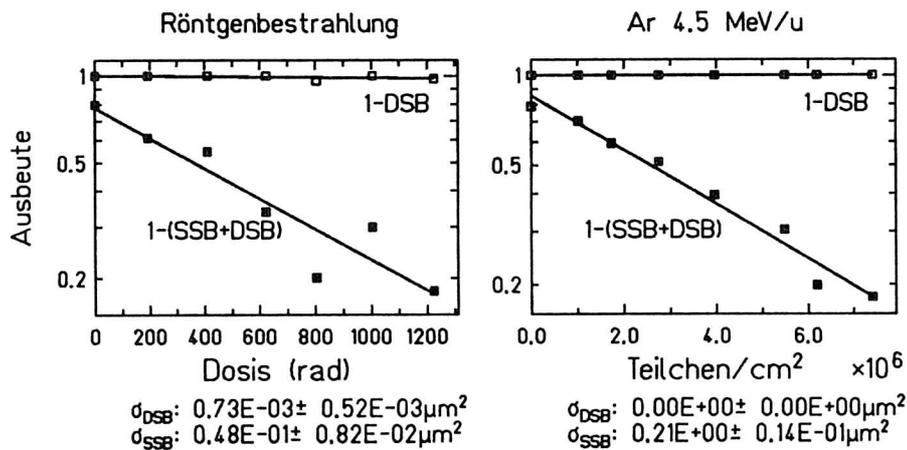


Abb.4.2 Gel-Elektrophorese : Röntgenstrahlung und 4.5 MeV/u Argon

Abzisse : Abnahme der intakten Form 1-(DSB+SSB)

Abnahme der intakten Form + Einzelstrangbruch 1-DSB

Aufgetragen ist die Abnahme der ungeschädigten Form . Diese ist allein auf einen Zunahme des Anteils an Einzelstrangbrüchen zurückzuführen , wie die Konstanz des Anteils and Doppelstrangbrüchen (0%) zeigt . Die Abnahme gehorcht dem theoretischen exponentiellen Gesetz .

Zunächst wurde den elektrooptisch gemessenen Kurven eine Funktion aus der Summe von drei Exponentialfunktionen und einer Konstanten angepaßt . Die Ergebnisse der für jeden Meßpunkt aufgenommenen acht Kurven wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt . Bei sieben freien Parametern war die Standardabweichung etwa 30% vom Mittelwert . Abb. 4.3 und Abb.4.4 zeigen die Ergebnisse der Analyse für die Röntgenbetrahlung . Die Abfallszeiten sind in μs angegeben , die Amplituden in Prozent von der Gesamthöhe der Kurve , da die Absoluthöhe der Kurven variiert .

Offensichtlich sind die sieben Parameter der Anpassungsfunktion durch die gemessenen Kurven nicht wohldefiniert . Um die Anzahl der freien Parameter zu reduzieren , wurden die Amplituden der Exponentialfunktionen vorgegeben . Dabei wurden die Ergebnisse aus der Anpassung mit sieben freien Parametern gemittelt und der Routine als Konstanten übergeben . Dies läßt sich nicht theoretisch begründen , sondern wird durch die geringe Variation der Amplituden bei der freien Anpassung nahegelegt (Abb.4.3a) . Damit ließ sich die Standardabweichung für die mittlere und die lange Zeitkonstante auf etwa 10% reduzieren ; der Fehler der kurzen Abfallszeit blieb fast unverändert (Abb.4.4b) . Allerdings mußte bei dieser Anpassung zusätzlich der konstante Term a_0 vorgegeben werden , damit die Routine überhaupt konvergierte .

Im Idealfall überlappen sich die Verteilungen der Relaxationszeiten für die beiden Konformationen nicht oder nur wenig überlappen . Dann würden sich hauptsächlich die Amplituden ändern . Gibt man also die Relaxationszeiten vor , bestimmt durch Mittelung der Werte aus der freien Anpassung , reduziert sich die Standardabweichung für alle drei Amplituden auf etwa 3% . Eine Vorgabe des konstanten Termes a_0 ist nicht notwendig (Abb4.3b) .

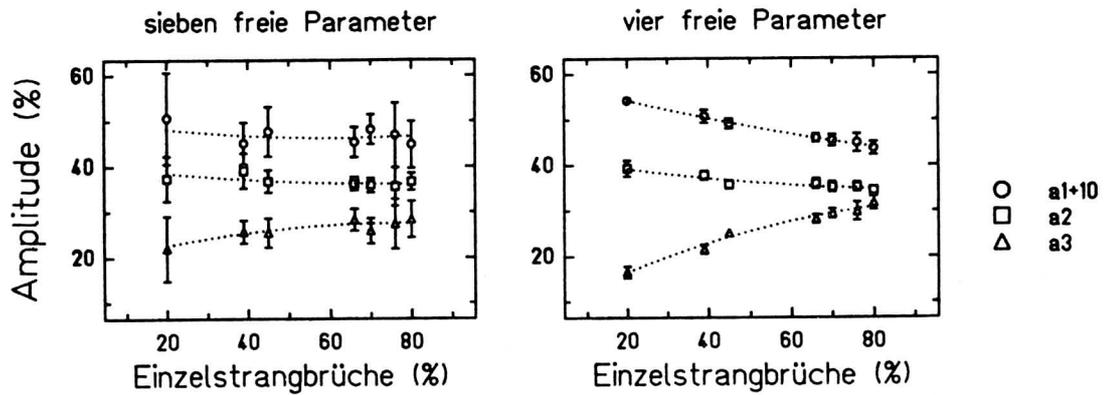


Abb.4.3 angepaßte Amplituden von röntgenbestrahltem PHW
 a) Ergebnisse der Anpassung mit sieben freien Parametern
 b) Ergebnisse der Anpassung mit vier freien Parametern ;
 die vorgegebenen Zeiten sind Mittelwerte aus der
 freien Anpassung

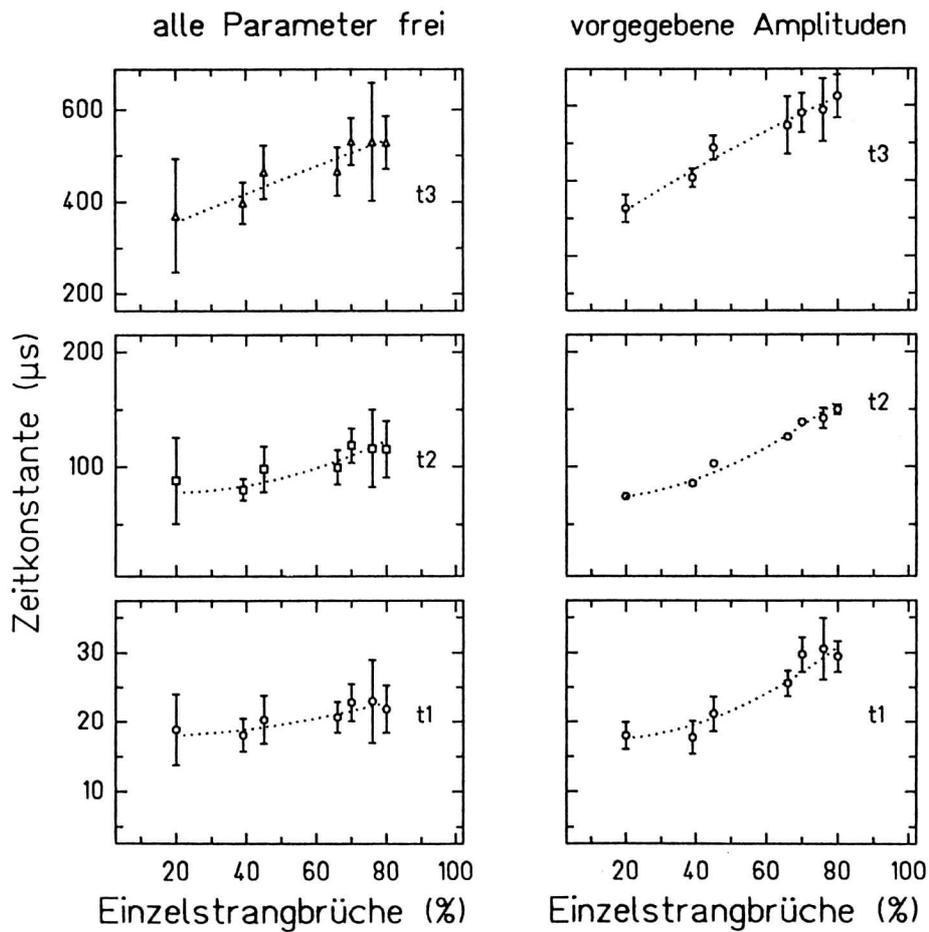


Abb.4.4 angepaßte Abfallszeiten für röntgenbestrahltes PHW
 a) Ergebnisse bei einer Anpassung mit sieben freien Parametern
 b) Anpassung mit vier freien Parametern , die Anteile der
 einzelnen Komponenten wurden durch Mittelung der Werte
 aus 4.3a berechnet

4.1.1 Vergleiche mit berechneten Kurven

Vergleiche mit berechneten Kurven, die aus drei Exponentialfunktionen zusammengesetzt sind, die typischen Werten der Meßkurven entsprechen, zeigen, daß das oben beschriebene Verhalten auf das limitierte Signal-zu-Rausch Verhältnis zurückzuführen ist. Um die berechneten Kurven mit den gemessenen Kurven vergleichen zu können, wurde den Kurven experimentell gemessenes Rauschen überlagert. Auch bei den berechneten Kurven ergibt sich bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 60:1 bei einer Anpassung mit sieben freien Parametern eine Standardabweichung von bis zu 30% vom Mittelwert. Durch Vorgabe der Amplituden läßt sich der Fehler auf etwa 5% bei der langen Komponente und auf 10% bei den kürzeren Komponenten reduzieren. Mit abnehmendem Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird auch bei der Anpassung mit festen Zeiten der Fehler schnell größer. Die Mittelwerte selbst weichen wenig von den Originalwerten ab. Durch Vorgabe der Abfallszeiten verschwinden die Abweichungen fast völlig (Abb. 4.5).

Eine Reduktion des S/R-Verhältnisses durch Aufsummieren der Kurven, nachdem sie auf eine einheitliche Höhe normiert wurden, mit nachfolgender Analyse hat keinen nennenswerten Einfluß auf die Werte der berechneten Parameter. Das gilt auch für Kurven, die vor der Analyse geglättet wurden. In beiden Fällen stimmen die Ergebnisse auf etwa 2% mit den Werten überein, die man aus der Mittelung der Ergebnisse der acht Kurven erhält.

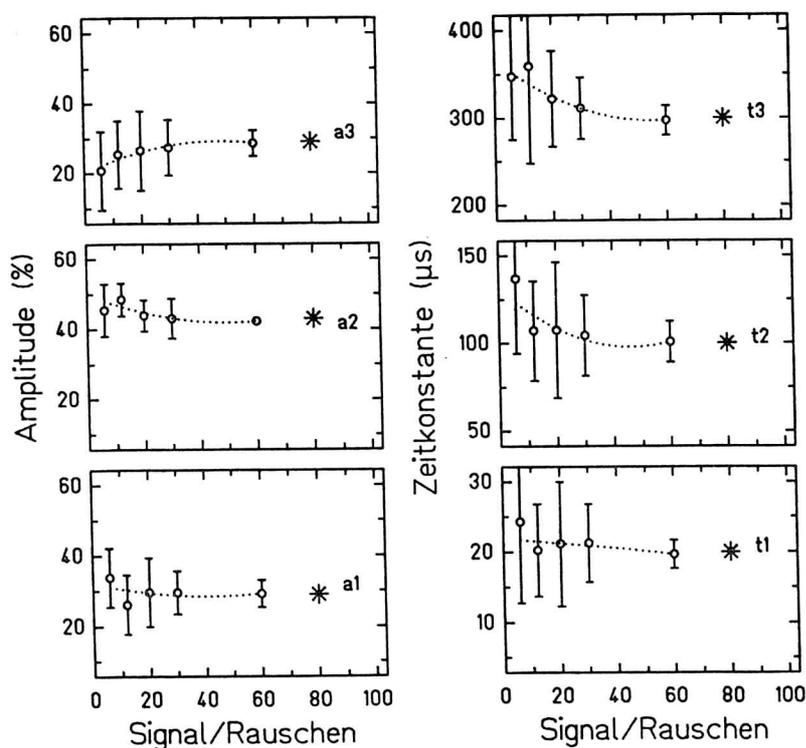


Abb.4.5 Abhängigkeit der Mittelwerte und der Standardabweichung berechneter Kurven vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/R). Je acht Kurven wurden gemittelt, * zeigt den Wert bei einer Anpassung ohne Rauschen (= Originalwert)
a) sieben freie Parameter bei der Anpassung

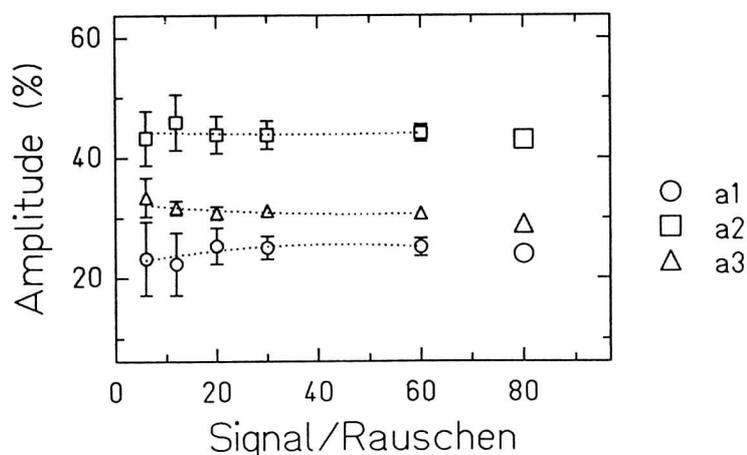


Abb.4.5b Reduktion der Standardabweichung durch Vorgeben der Zeiten , ermittelt durch Mittelung der Ergebnisse der freien Anpassung . Die isolierten Punkte rechts bezeichnen die Amplitude , die der Berechnung zugrunde lag .

4.1.2 Reproduzierbarkeit der Parameter

Aufgrund der vielfältigen Beiträge bei den Relaxationskurven ist eine direkte Zuordnung zwischen den angepaßten Parametern und dem Anteil an Strangbrüchen nicht möglich . Man ist also auf Eichkurven angewiesen . Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen , wurden die Parameter einer Messung von argonbestrahlten Proben (4.5 MeV/u) mit denen der Röntgenbestrahlung verglichen . Die für die beiden Messungen verwendeten Feldstärken unterscheiden sich nur wenig (2400 V/cm , 2460V/cm) , während die Pulsdauern sich stark unterschieden (330 μ s , 430 μ s) . Der Unterschied in den Pulslängen hat in diesem Bereich keine Konsequenzen für die Werte der Relaxationszeiten (siehe Abschnitt 4.2) .

Der Vergleich der Amplituden bei vorgegebenen Zeiten , die für beide Messungen gleich gewählt wurden , zeigt eine gute Übereinstimmung der angepaßten Parameter . Dies gilt besonders für die lange Zeitkomponente , für die die signifikanteste Abhängigkeit der Amplitude vom Anteil an Strangbrüchen zu sehen ist (Abb.4.6c).

Um die Reproduzierbarkeit bei Verwendung von vorgegebenen Amplituden zu prüfen , wurden die Amplituden der freien Anpassung der argonbestrahlten Kurven als Konstante für beide Messungen gewählt (Abb.4.6b) . Die Übereinstimmung ist für die kurze Zeitkomponente schlecht , für die beiden anderen deutlich besser . Die Fehlerbalken für die Ergebnisse der Röntgenbestrahlung sind jedoch groß , da die Amplituden , die man aus Mittelung der Parameter aus der freien Anpassung der Röntgenkurven erhält , von denen der Argonbestrahlung abweichen . Bei Vorgabe dieser Werte als Amplituden wird die Übereinstimmung zwischen den beiden Messungen schlechter (Abb.4.6c) .

Eine Vorgabe der Zeiten ist also die geeignetere Methode, um die Anzahl der freien Parameter zu reduzieren. Ein solches Vorgehen erscheint auch sinnvoller. Jedoch ist die schwache Änderung der Amplituden bei der freien Anpassung kein Artefakt der Anpassungsroutine: eine Änderung der Reihenfolge in der Routine bezüglich der Parameter oder eine Änderung der Startwerte führten immer zu denselben Ergebnissen (innerhalb 1% Abweichung).

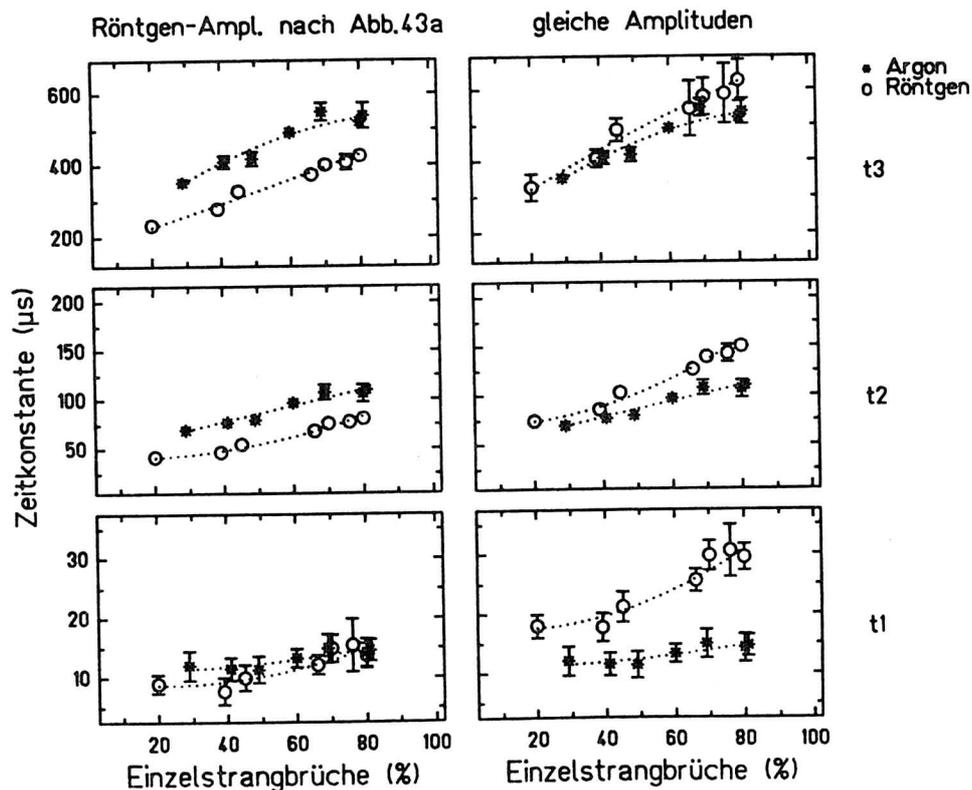


Abb.4.6 Vergleich zweier Messungen: schlechte Reproduzierbarkeit der angepaßten Zeitkomponenten bei Vorgabe der Amplituden

- Die Werte für die vorgegebenen Amplituden wurden für beide Messungen getrennt aus der freien Anpassung bestimmt.
- Die Werte der argonbestrahlten Proben wurden für die Anpassung der röntgenbestrahlten Kurven verwendet. Die Fehler für die Röntgenwerte sind deshalb groß.

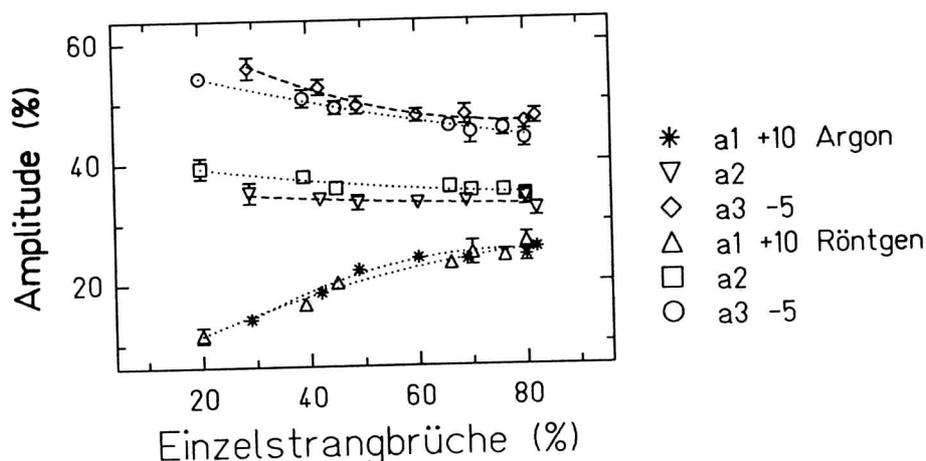


Abb.4.6 Vergleich einer Messung von röntgenbestrahlten Proben mit argonbestrahlten Proben (4.5 MeV/u)
 c) gute Übereinstimmung der Amplitude der langen Komponente bei vorgegebenen Abfallszeiten (für beide Messungen gleich)

Bei der Analyse mit reduzierter Anzahl an Parametern stellt sich die Frage , welche Werte die fixierten Größen erhalten sollen . Da die Änderungen der angepaßten Parameter relativ zu den Werten der unbestrahlten Kontrollen gemessen werden sollen , bietet sich an , die Abfallszeiten der Kontrollen als vorgegebene Zeiten zu verwenden . Abb.4.8 zeigt die relativen Anteile der drei Relaxationszeiten , wobei als Abfallszeiten die der Kontrollen verwendet wurden . Diese Werte waren für die beiden dargestellten Messungen (Argon- und Röntgenbestrahlung) identisch . Die Übereinstimmung der Daten ist ähnlich gut wie bei der Verwendung von Mittelwerten . Die Änderung der Amplituden in Abhängigkeit vom Anteil an Strangbrüchen ist etwas stärker . Es ist festzustellen , daß hier die Änderung mit wachsendem Anteil an geschädigter DNA auf die mittlere und die lange Komponente beschränkt ist . Die Güte der Anpassung ist bei dieser Vorgehensweise für die Proben mit hohem Anteil an Strangbrüchen jedoch deutlich schlechter als bei Verwendung von Mittelwerten . Abb.4.8 zeigt die Meßkurve einer Probe mit 70% Einzelstrangbrüchen . Die Anpassung wurde mit den Relaxationszeiten der Kontrolle (20% SSB) durchgeführt . Die χ^2 -Abweichung erhöhte sich gegenüber dem Wert bei freier Anpassung um etwa einen Faktor 1.5-2 . Bei der Verwendung von Mittelwerten änderte sich die Güte der Anpassung gegenüber einer freien Anpassung sehr wenig . Deshalb wurden bei den weiteren Analysen mittlere Zeitkonstanten vorgegeben , auch wenn dabei der Verlauf der angepaßten Amplituden flacher ist .

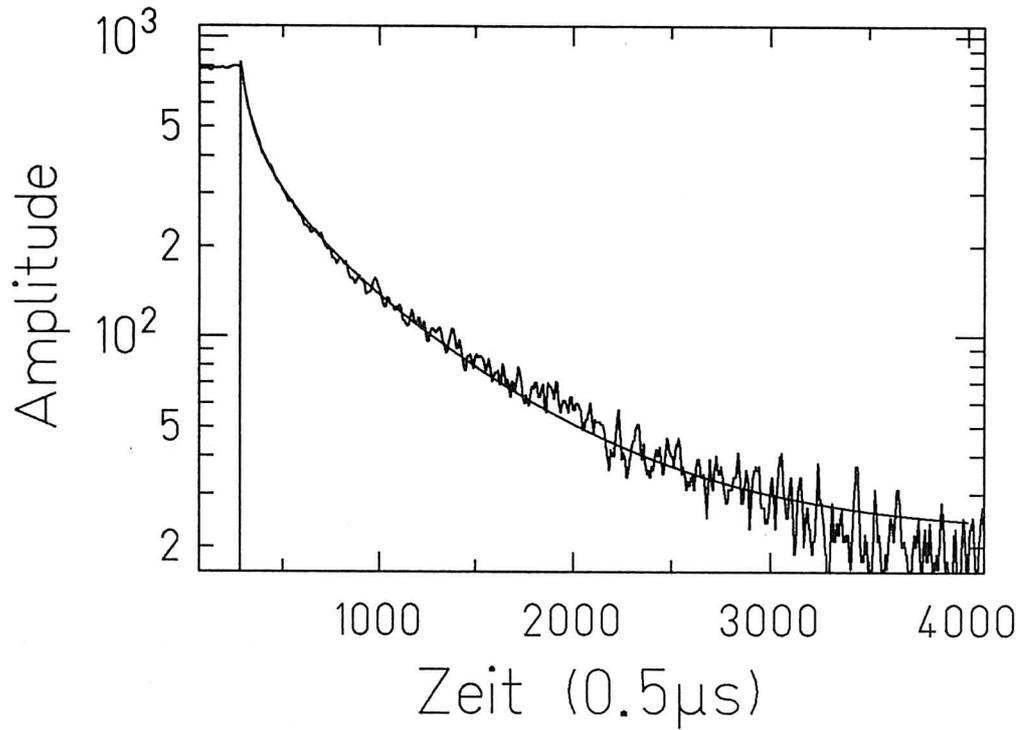


Abb.4.7 Meßkurve einer bestrahlten Probe (70% Einzelstrangbrüche) :
 der angepaßten Kurve wurden die Abfallszeiten einer unbestrahlten
 Probe vorgegeben, was zu einer schlechten Anpassung führt

Amplituden bei durch Kontrollen
 vorgegebenen Zeiten

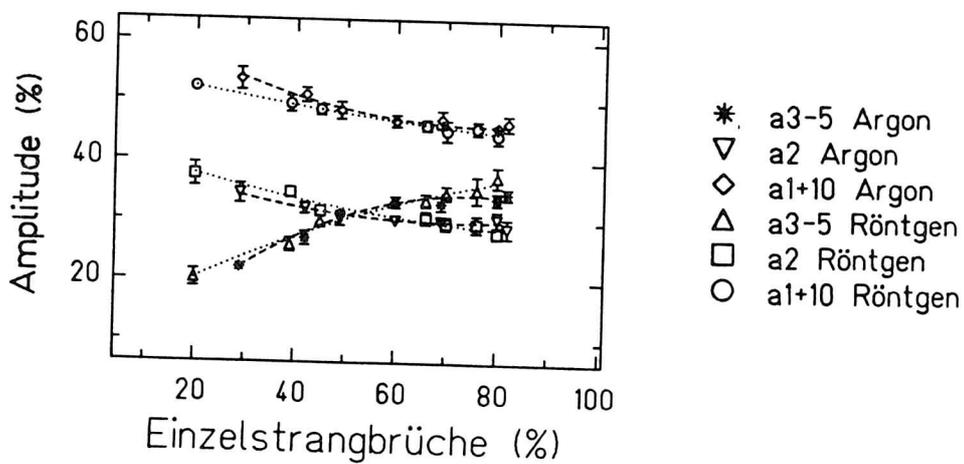


Abb.4.8 Vergleich der Messungen mit Röntgenbestrahlung und 4.5 MeV/u Ar
 bei Anpassung der Kurven mit Abfallszeiten , die durch die der
 Kontrollen bestimmt sind

4.2 Einfluß von äußeren Bedingungen

Neben dem Anteil an Strangbrüchen nehmen auch andere Größen Einfluß auf die Werte der Analyseparameter. Die wichtigsten Bedingungen sind im folgenden aufgeführt.

4.2.1 Feldstärke und Pulsdauer

Das angelegte Feld dreht nicht nur die Moleküle, sondern ändert auch die dreidimensionale Struktur. Die dadurch bedingte Änderung der relativen Amplituden zeigt Abb.4.9. Es handelt sich wieder um die röntgenbestrahlten PHW-Plasmide in EO-Puffer. Wie die Abnahme des Anteils der langen Zeitkomponente zeigt, werden die Moleküle mit wachsender Feldstärke in eine zunehmend kompakte Form übergeführt. Eine Zunahme der Pulsdauer zeigt eine gegenläufige Tendenz. Dies ist allerdings nicht einleuchtend. Bezüglich der Pulsdauer ist festzustellen, daß in dem Bereich, in dem während der Dauer des angelegten Pulses Sättigung der Orientierung erzielt wurde, die Abhängigkeit der Parameter von der Pulsdauer schwach ist. Die Übereinstimmung der beiden Messungen in Abschnitt 4.1 ist deshalb trotz der unterschiedlichen Pulsdauer gut. Messungen, die mit PHW in TE-Puffer durchgeführt wurden, zeigten vergleichbare Ergebnisse.

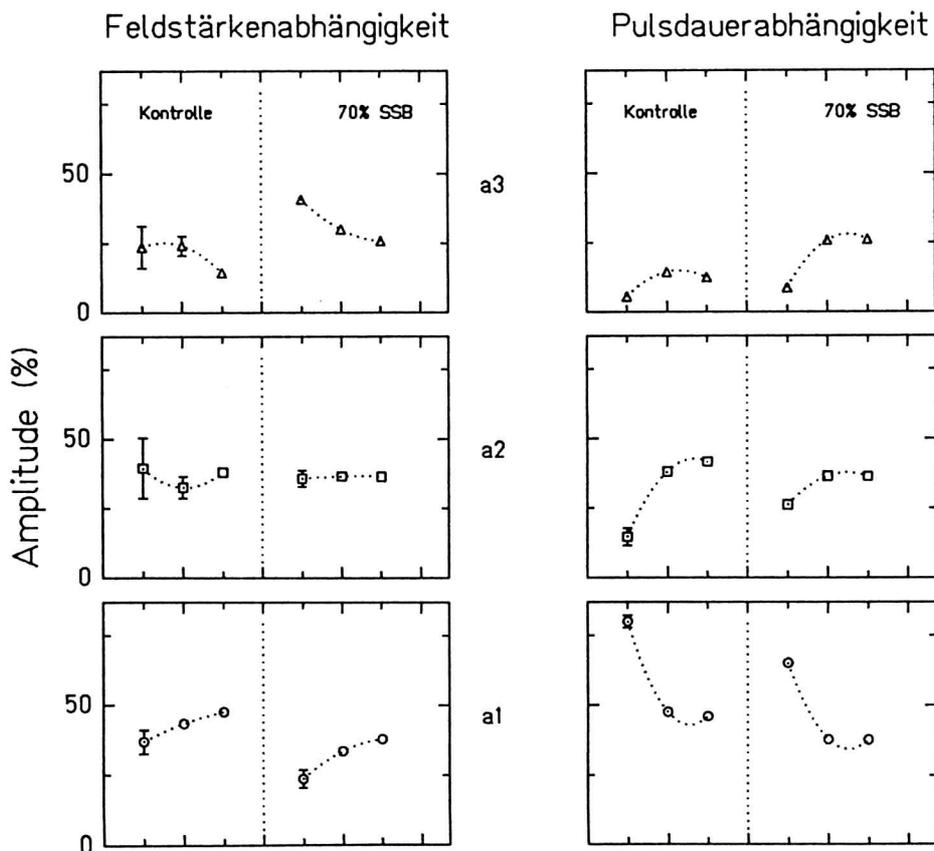


Abb.4.9 Abhängigkeit der Parameter von Feldstärke und Pulsdauer

a) 400V 700V 1000V /3mm bei 330 μ s

b) 20 μ s 330 μ s 500 μ s bei 1000V/3mm

Da die verschiedenen Konformationen unterschiedlich auf geänderte Feldstärke und Pulsdauer reagieren, läßt sich durch geeignete Wahl dieser Größen die Abhängigkeit der Parameter vom Anteil an Strangbrüchen optimieren. Zweites Kriterium dabei ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, das sich durch hohe Feldstärken stark verbessern läßt. Dem sind jedoch durch Aufheizung der Probe Grenzen gesetzt: bei sehr hohen Feldstärken beginnt die Probe schnell zu kochen, so daß nur wenige Messungen mit einer Probe durchgeführt werden können. Dasselbe gilt für lange Pulsdauern.

4.2.2 Einfluß des Meßprozesses

Um festzustellen, in welcher Weise die Messung selbst die Proben verändert, wurde eine Probe vierzigmal hintereinander unter identischen Bedingungen gemessen. Abb. 4.10 zeigt die Ergebnisse einer Anpassung mit sieben und mit vier freien Parametern. Die Messung dauerte etwa eineinhalb Stunden. Jeweils vier Kurven wurden innerhalb von 20 s aufgenommen, die nächsten etwa 10 min später. Die Messungen wurden bei 2400V/cm und 330 μ s Pulsdauer durchgeführt. Man sieht eine etwas größere Bandbreite an Parametern etwa ab der 25. Messung bei sieben freien Parametern. Bei der Analyse mit nur vier freien Parametern sind die Werte über die gesamte Zeit hinweg stabil. Weder die lange Verweildauer in der Zelle, während der sich die Probe erwärmte, noch die Wechselwirkung mit dem angelegten Feld veränderten die Ergebnisse in sichtbarer Weise. Da andererseits das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei dieser Feldstärke ausreichend groß ist und Sättigung der Orientierung bei 330 μ s eintritt, erweist sich diese Kombination als geeignete Wahl zur Durchführung der Messungen

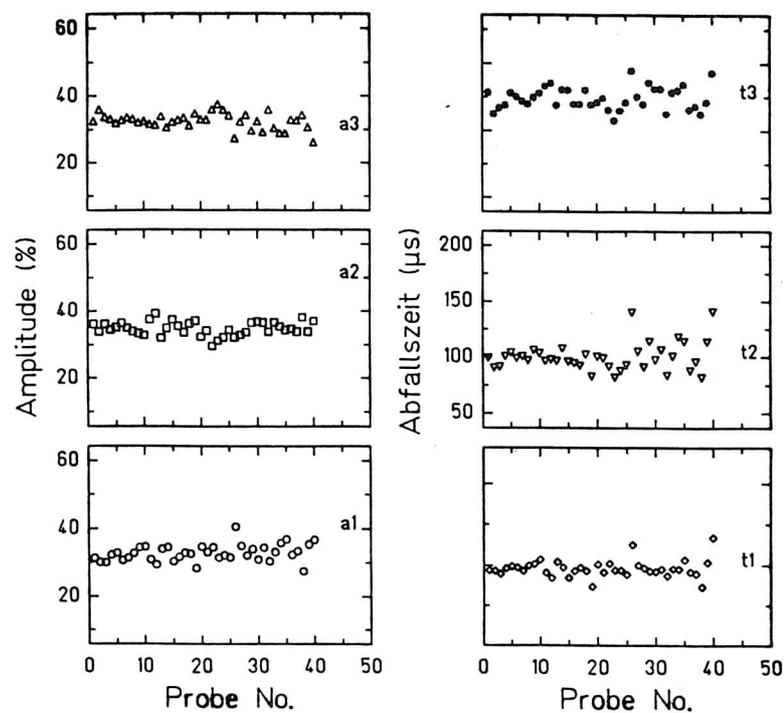


Abb.4.10a Abhängigkeit der Messung von der Zeit (Dauer : 1.5 h) ; die Probe wurde 40mal unter gleichen Bedingungen gemessen. Die Parameter sind die Ergebnisse der freien Anpassung. Nach etwa 1 h (Probe 25) wird die Streuung um den Mittelwert größer .

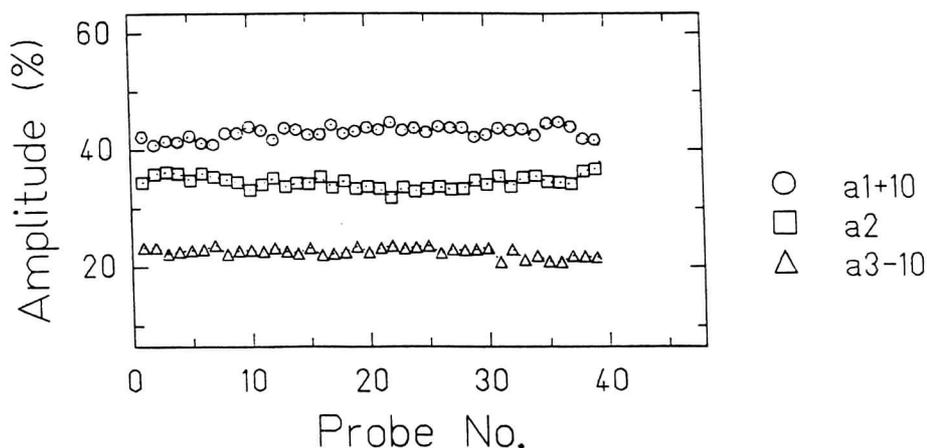


Abb.4.10b Amplituden bei vorgegebenen Zeiten :
die Werte sind über die gesamten 1.5 h stabil .

4.2.2 Zusammensetzung und Konzentration der Pufferlösung

Der Einfluß der Pufferzusammensetzung auf die Relaxationszeiten von Restriktionsfragmenten wurde in der Vergangenheit ausführlich untersucht . Insbesondere die Wirkung von einwertigen Ionen (Na^+) und zweiwertigen Ionen (Mg^{2+}) waren Gegenstand der Untersuchung [Stell],[Hag81] . Dabei spielt sowohl die Stabilisierung des DNA-Rückgrates als auch der Einfluß der Ionen auf Größe und Polarisierbarkeit der Ionenhülle eine Rolle . Die Stabilisierung des DNA-Rückgrates durch Mg^{2+} zeigt Abb. 4.11 . Der EO-Puffer enthält 0.1mM MgCl_2 . Die Mg^{2+} -Ionen lagern sich zwischen den Phosphat-Ionen an und stabilisieren so das Molekül . Die einwertigen Na^+ -Ionen haben keine stabilisierende Wirkung . Demzufolge sind die Relaxationszeiten von PHW in EO-Puffer (Mg^{2+}) größer als in TE-Puffer (Na^+) , der keine zweiwertigen Ionen enthält . Darüber hinaus unterscheiden sich die Relaxationszeiten von geschädigter und ungeschädigter DNA in EO-Puffer stärker als in TE-Puffer . Letzterer ist also für diese Art der Messung weniger geeignet .

Die Abhängigkeit der Relaxation von der Konzentration der Mg^{2+} -Ionen wurde nur in dem engen Bereich zwischen 0.14 mM und 0.3mM überprüft . Es konnte im Rahmen dieser Untersuchung keine signifikante Abhängigkeit festgestellt werden . Dasselbe gilt für die Abhängigkeit von der DNA-Konzentration im Bereich von $20\mu\text{g/ml}$ bis $60\mu\text{g/ml}$.

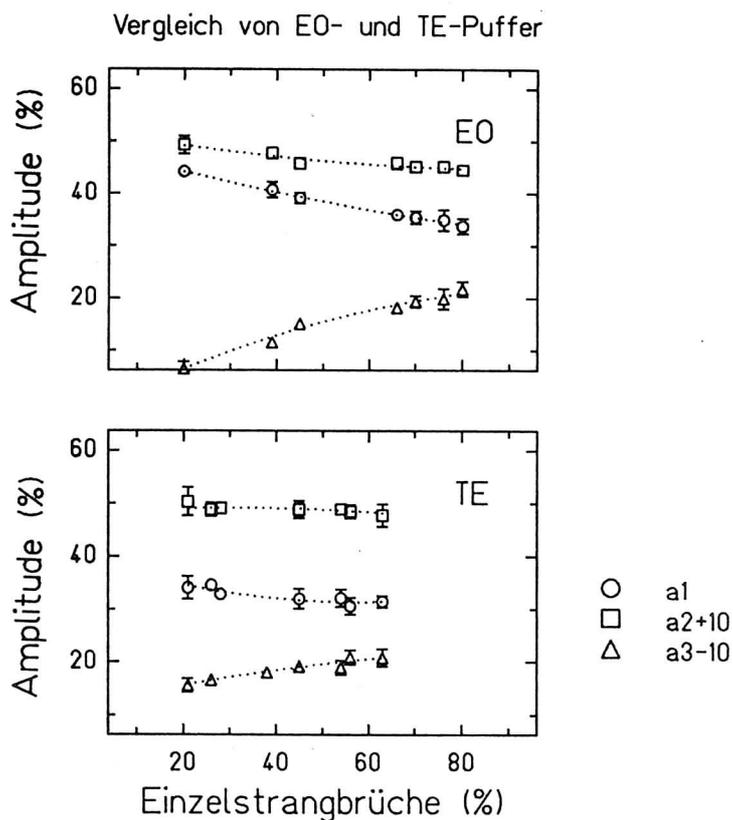


Abb.4.11 Einfluß der Pufferlösung : Amplituden bei Anpassung mit vorgegebenen Zeiten

- a) EO-Puffer mit deutlicherer Dosisabhängigkeit
- b) Amplituden bei Verwendung von TE-Puffer

4.3 Weitere Messungen

4.3.1 SV40 5200 bp

Das Plasmid SV40 wurde vor allem deshalb verwendet, weil es in den früheren Experimenten Gegenstand der Untersuchung war und erfolgversprechende Resultate lieferte. Da es in der Größe dem Plasmid PHW sehr ähnlich ist, erwartet man ähnliche Ergebnisse bei der elektrooptischen Messung. Es zeigte sich bei der Gelelektrophorese, daß der Wirkungsquerschnitt für Doppelstrangbrüche bei Röntgenbestrahlung nur um einen Faktor 8 kleiner ist als für Einzelstrangbrüche und insgesamt das Plasmid etwas strahlungsresistenter, so daß die Ausbeute an Einzelstrangbrüchen im Vergleich zu PHW geringer war, obwohl die Proben zusammen bestrahlt wurden. Abb. 4.12 zeigt die Ergebnisse der Gelelektrophorese und der elektrooptischen Messung einer Röntgenbestrahlung in EO-Puffer. Aufgetragen gegen den Anteil an Einzelstrangbrüchen zeigt sich, daß die Übereinstimmung mit den PHW-Resultaten recht gut ist.

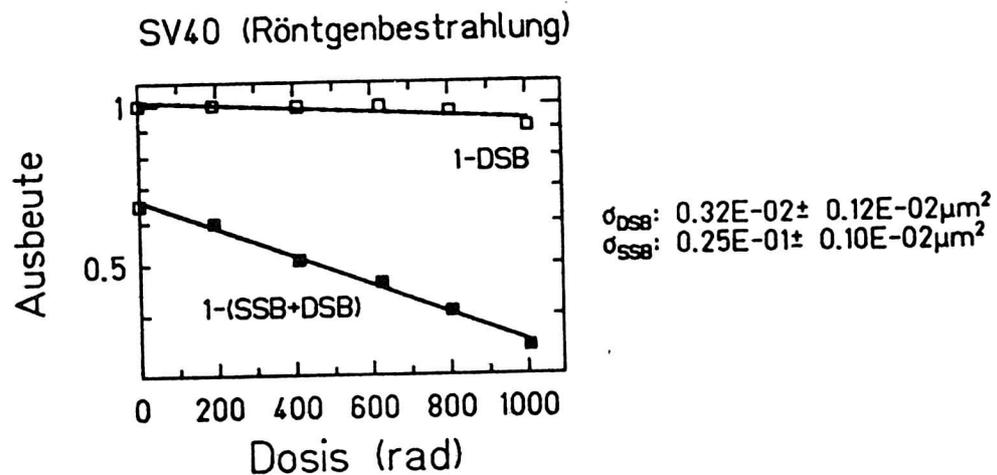


Abb. 4.12a Ausbeute an Strangbrüchen bei röntgenbestrahlten SV40 :
Ergebnisse der Gel-Elektrophorese , Bestrahlung in EO-Puffer

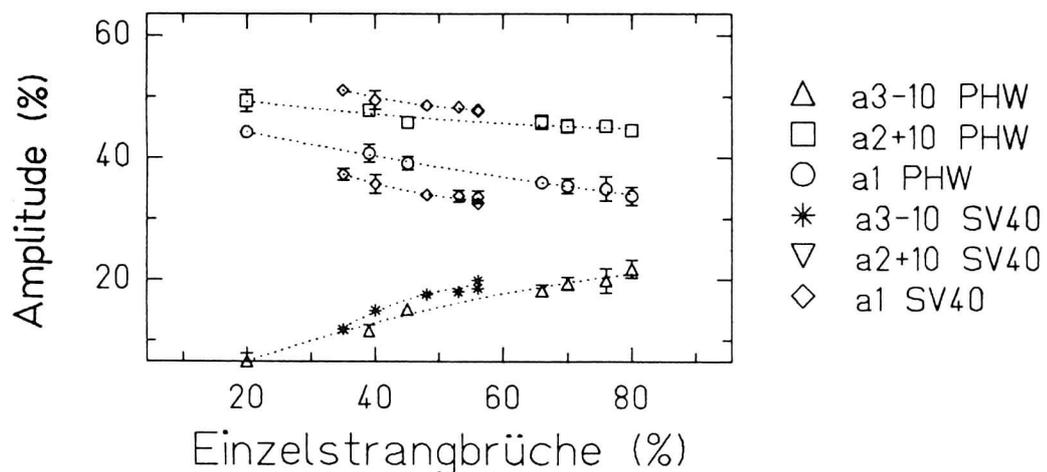


Abb.4.12b Amplituden der elektrooptischen Messung ;
Zeiten vorgegeben und ermittelt aus der freien Analyse .
Die Amplitude der langen Zeitkomponente stimmt gut überein mit
den Messungen an PHW , das etwa gleich groß ist .

4.3.2 PUC 2700 bp

Etwa 18% des Plasmids traten als Dimer auf . Die intakte Konformation der dimeren Form ist bezüglich seiner Wanderungsgeschwindigkeit im Gel der Einzelstrangbruchform der monomeren Form sehr ähnlich . Durch diese Zusammensetzung ist man vermutlich am Rande dessen angelangt , was die Methode zu leisten vermag . Abb.4.13 zeigt das Ergebnis der Gel-Elektrophorese , aufgeschlüsselt für die Monomere und die Dimere bei Bestrahlung mit 11 MeV . Es wurde zunächst die Bestrahlung in TE-Puffer vorgenommen , dann die Messungen durchgeführt , über Nacht gegen EO-Puffer dialysiert und nochmals gemessen . Abgesehen von den durch die zwischenzeitliche Behandlung möglicherweise induzierten Strangbrüchen wurden die gleichen Proben in zwei verschiedenen Puffern elektrooptisch untersucht . Allerdings ist die Prozedur

des Dialysierens nicht ohne Konsequenzen für die Moleküle gewesen, da die angepaßten Parameter für die EO-Messung keine kontinuierliche Tendenz zeigen (Abb.4.14a). Es ist im Gegensatz zu den Ergebnissen der PHW-Messungen keine deutlichen Unterschied in der Stärke der Dosisabhängigkeit bei den verschiedenen Puffern zu bemerken. Falls durch die Dialyse zusätzliche Strangbrüche induziert worden wären, könnte das diesen Effekt erklären: bei hohem Anteil an Strangbrüchen wird die Kurve der Parameter flacher. Die Ergebnisse der Gel-Elektrophorese zeigen eine Erhöhung des Anteils der Strangbrüche um maximal 5%, was bei der Genauigkeit der Methode innerhalb der Fehlergrenzen liegt. Der Anteil an Dimeren ist in der elektrooptischen Messung nicht von einer Zunahme an Strangbrüchen zu unterscheiden. Der flache Verlauf der EO-Kurve ist vermutlich eine Konsequenz des Dimeranteils. Daraus folgt, daß im Bereich hoher Anteile an Molekülen mit langen Rotationszeiten der Unterschied zwischen EO- und TE-Puffer verschwindet.

In Abb. 4.14b sind die Werte aus einer Bestrahlung mit 11 MeV/u Argon zum Vergleich eingetragen. Die Übereinstimmung ist besser als erwartete, da bei verschiedenen Feldstärken gearbeitet wurde: 2400V/cm bei 4.5 MeV/u und 3000V/cm bei 11 MeV/u. Zudem sind bei den Kurven der 11 MeV/u - Messung Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Beginns des exponentiellen Abfalls aufgetreten. Den Kurven war eine wellige Struktur überlagert. Dieser Effekt verschwand, nachdem die Intensität des einfallenden Laserlichtes verringert worden war. Allerdings war das Signal nicht überdurchschnittlich hoch, so daß der Unterschied zu anderen Experimenten nicht klar ist. Die Konsequenz solcher Störungen ist u.a., daß die individuellen Kurven stärker voneinander abweichen.

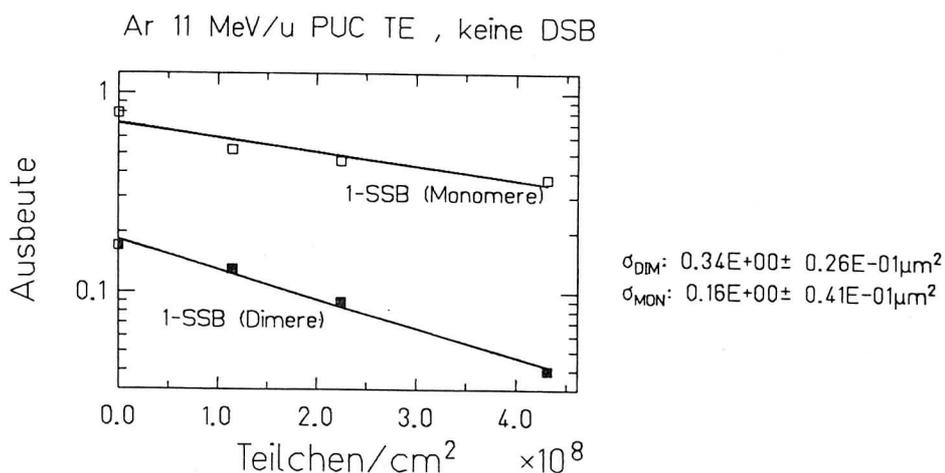


Abb.4.12 Ausbeute an Strangbrüchen bei argonbestrahltem PUC (11 MeV/u)
Ergebnisse der Gel-Elektrophorese

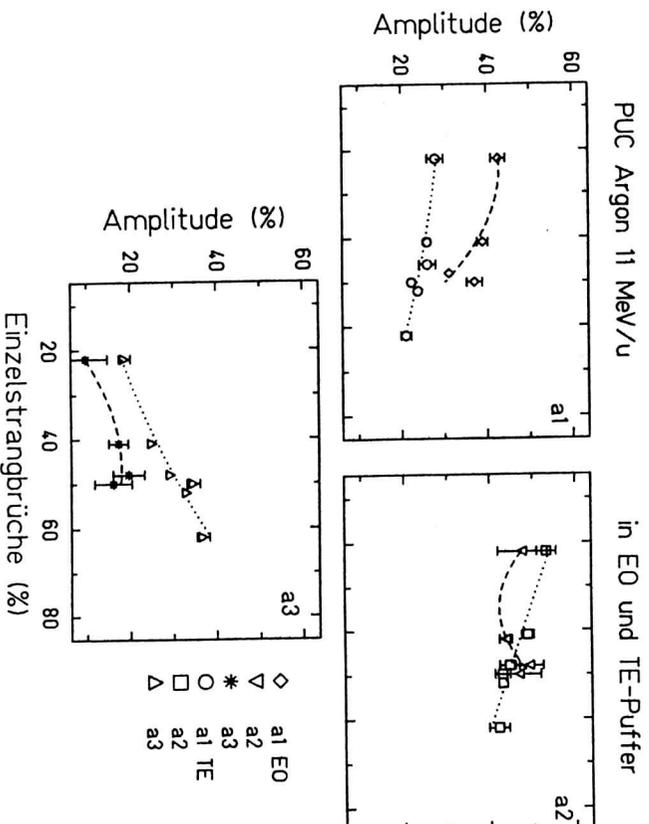


Abb. 4.13a Elektrooptische Ergebnisse , EO-und TE-Puffer
Die Zeiten sind vorgegeben .
Die EO-Proben sind aus der gleichen Bestrahlung wie die
TE-Proben, sie wurden nach der Bestrahlung dialysiert
(Messungen bei 2400 V/cm) .

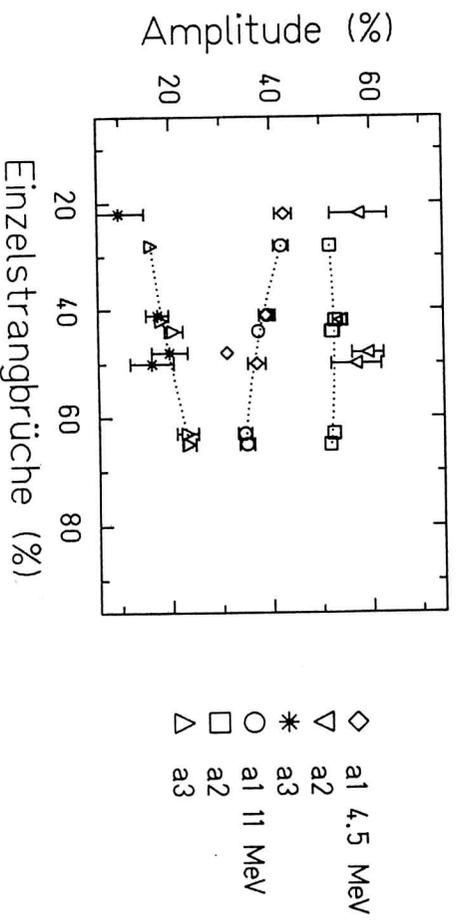


Abb.4.13b Vergleich der Werte für EO-Puffer mit Werten aus der 11 MeV/u Argon-
Bestrahlung (Messung bei 3000V/cm) ; die Abfallszeiten sind für beide
Anpassung gleich gewählt worden .

5. Zusammenfassung und Diskussion

5.1 Zusammenfassung

Die elektrooptische Messung von Rotationsdiffusionskoeffizienten einer DNA-Lösung erlaubt die Bestimmung des Anteils an Molekülen mit Einzelstrangbrüchen. Die Meßmethode beruht auf der Bestimmung des Anteils der längsten Komponente der drei Exponentialfunktionen der Anpassungsfunktion, die die Relaxation des elektrooptischen Signals beschreiben. Das limitierte Signal-zu-Rausch-Verhältnis läßt nur eine Anpassung zu, bei der die Abfallszeiten vorgegeben werden. Die Parameter, die hierbei bestimmt werden, sind das Produkt eines numerischen Verfahrens. Bei der Vielzahl der auftretenden dreidimensionalen Strukturen, die die flexiblen Moleküle beider Konformationen annehmen können, ist eine Zuordnung der Werte, die die Analyseroutine liefert, nur bedingt möglich. Die Variation der angepaßten Amplituden mit dem Anteil an Strangbrüchen hängt von der Wahl der vorgegebenen Zeiten ab, wie ein Vergleich zwischen den Ergebnissen für mittlere Abfallszeiten und die der Kontrollproben zeigt. Deshalb ist eine Interpretation sehr schwierig. Insbesondere die Rotationsbewegungen, die zur kurzen und mittleren der angepaßten Zeitkonstanten beitragen, sind schwierig zuzuordnen. Die Annahme, daß die Relaxationszeiten der Gesamtrotation für die beiden Konformationen (intakt, Einzelstrangbruch) sich genügend unterscheiden, um anhand der Gruppe der langen Abfallszeiten den Anteil an Einzelstrangbrüchen zu bestimmen, ist durch die Messungen bestätigt worden. Die schwache Variation der Amplitude der mittleren, angepaßten Zeitkonstante scheint daraufhin zu deuten, daß im mittleren Bereich die Beiträge durch die langen Abfallszeiten der intakten Konformation und die mittleren Abfallszeiten durch Bewegung von Segmentgruppen der Strangbruchform etwa gleich groß sind. Das führt dazu, daß durch Erhöhen des Anteils an Strangbrüchen die Anteile durch intakte Moleküle abnehmen, der Verlust aber durch die Zunahme des Anteils der Strangbruchformen ausgeglichen wird. Daher ist die Gesamtänderung gering. Um genauere Aussagen über die Verteilung der Relaxationszeiten machen zu können, müßte man allerdings Modellrechnungen durchführen und mit den Messungen vergleichen. Die Messungen allein lassen nur spekulative Aussagen zu.

Bei der Verwendung von gemittelten Werten als Abfallszeit muß man sich für jedes Plasmid, gemessen unter bestimmten Versuchsbedingungen, auf einen Satz von Zeiten festlegen. Es ist nicht gemeint, daß man für jede Messung die Werte der freien Anpassung mittelt und als Konstanten übergibt, denn dann hinge der Mittelwert von dem Dosis-Bereich ab, der mit der Messung überdeckt wurde. Die Erstellung einer Eichkurve, mit der der Bereich, in dem die Methode sinnvoll angewendet werden kann, abgesteckt wird, liefert auch die für die weiteren Messungen vorzugebenden Relaxationszeiten. Beim Plasmid PHW geht der Bereich bis etwa 70% Einzelstrangbrüchen. Bei höherem Anteil wird die Kurve flach, so daß die Zuordnung Relaxationszeit - Strangbruchanteil mit einem großen Fehler behaftet ist. Man darf dabei nicht vergessen, daß der Fehler bei der Bestimmung des Strangbruchanteils mittels der Gel-Elektrophorese bei etwa gleichen Anteilen der beiden Konformationen etwa 1/10 beträgt, bei ungleicher Verteilung mehr. Bei der Erstellung der Eichkurven sollten also möglichst mehrere Messungen bei der Bestimmung

des Strangbruchanteils durchgeführt werden, da eher hier die Limitierung in der Genauigkeit zu sehen ist als in der Genauigkeit der elektrooptischen Messung. Dies gilt zumindest, wenn man die Standardabweichung der Mittelwerte als maßgeblich betrachtet. Um eine zuverlässige Fehlerabschätzung zu erhalten, müssen mehrere Meßreihen durchgeführt werden. Die beiden Meßreihen, die hier vorgestellt wurden, erlauben nur eine erste Beurteilung der Reproduzierbarkeit.

Der Vergleich der PHW mit der SV40-Messung zeigt, daß die Relaxationszeiten in erster Linie von der Größe der DNA-Moleküle abhängen. Dennoch müssen für jedes Plasmid eigenen Eichkurven gemessen werden, da die Strahlungsempfindlichkeit verschieden sein kann und damit auch der Bereich, in dem die Methode sinnvoll anwendbar ist.

Die Messungen am Plasmid PUC zeigen, daß die Reinheit der Kontrollprobe wichtig ist. Der Verlauf der angepaßten Parameter deuten an, daß für geringe Anteile an Strangbrüchen die Kurve steiler wird (Abb.4.3b). Je geringer also der Anteil an Strangbrüchen an in der Kontrolle ist, desto sensitiver ist die Messung auf geringe Änderungen.

Obwohl die feldfreie Relaxation der Moleküle gemessen wurde, um ausschließlich die hydrodynamischen Eigenschaften zu bestimmen, ist ein starker Einfluß der Feldstärke des orientierenden Feldes und der Pulsdauer zu beobachten. Dies ist eine Folge der Flexibilität der Moleküle. Die Wechselwirkung mit dem elektrischen Feld führt nicht nur zu einer Rotation des Gesamtmoleküls, sondern auch zu Translations- und Rotationsbewegungen von Segmenten. Dies führt zu einer Änderung der dreidimensionalen Struktur jedes einzelnen Moleküls. Mit wachsender Feldstärke werden die Moleküle zunehmend gefaltet. Bei Pulsdauern, die nicht zu einer Sättigung der Orientierung führen, vergrößert eine Verlängerung des Pulses die mittlere Relaxationszeit. Im Bereich der Sättigung, also ab etwa $200 \mu\text{s}$, ist nur eine geringe Variation zu sehen. Da die einzelnen Konformationen sich hinsichtlich der Steilheit des Anstieges des elektrooptischen Signals unterscheiden, ist die gesättigte Orientierung als Ausgangszustand für die Relaxation zu wählen, um einen möglichst identischen Anfangszustand zu erhalten. Es gibt jedoch Hinweise, daß bei sehr hohen Feldstärken (10kV) lange Pulsdauern zusätzliche Konformationsänderungen verursachen [Stell].

Der geeignete Puffer für elektrooptische Messungen enthält Mg^{2+} -Ionen. Die Zweiwertigkeit des Mg^{2+} hat eine Stabilisierung der Moleküle zur Folge. Zwischen je zwei aufeinanderfolgende Windungen mit 0.34 nm Abstand lagert sich ein Mg^{2+} (Atomradius 0.16 nm) zwischen die negativ geladenen Phosphatgruppen ein. Die Zugabe von Mg^{2+} -Ionen reduziert die Abhängigkeit der Struktur von Feldstärke und Pulsdauer und erhöht die Empfindlichkeit auf Änderungen des Anteils an Strangbrüchen.

5.2 Ausblick

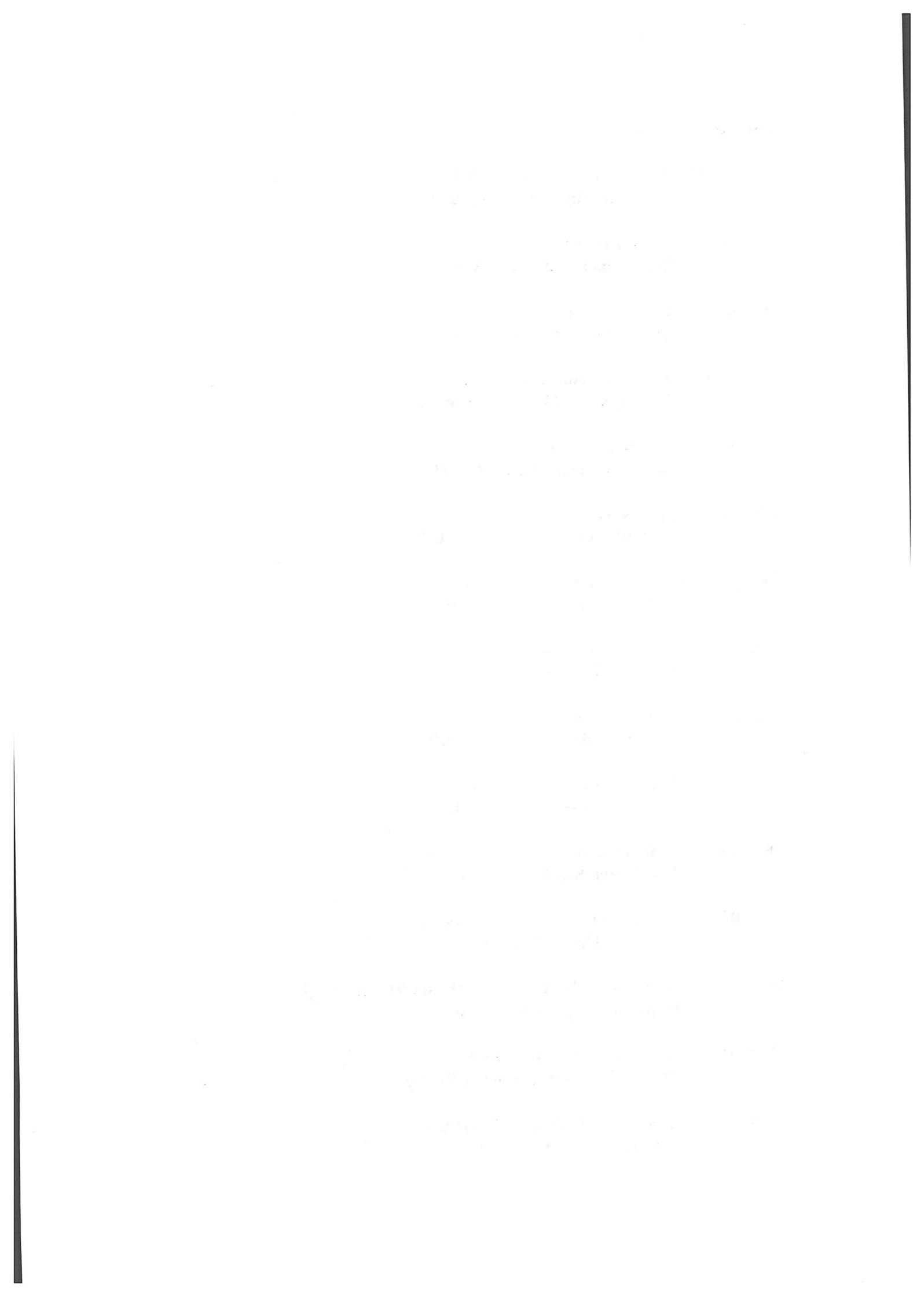
Bei der Realisierung der Messungen zur Untersuchung der Kinematik des Schadens sind bei der Einhaltung der Versuchsbedingungen einige Schwierigkeiten zu erwarten. Unabdingbare Voraussetzung für erfolgreiche Messungen sind ein mechanisch stabiler Aufbau und die Unterdrückung von Lichtquellen und elektronischen Störungen. Die Bestrahlung muß innerhalb von wenigen μs abgeschlossen sein. Um in dieser kurzen Zeit genug Energie zu deponieren, um etwa 40% Einzelstrangbrüchen zu erzielen, sind je nach Energie $10^7 - 10^9$ Teilchen/cm² bei der Verwendung von EO-Puffer notwendig. Da in Darmstadt nur am SIS, das hohe Teilchenenergien (bis 2 GeV/u) liefert, pro Puls genügend Teilchen zur Verfügung stehen, ist wegen des niedrigen LET der hochenergetischen Teilchen 10^9 Teilchen/cm² notwendig. Dieser Teilchenfluß soll in Zukunft möglich sein. Bei Bestrahlung mit einer solchen Dosisleistung ist es möglich, daß die Probe schon durch die Bestrahlung zu kochen beginnt. Dann wäre keine Messung möglich.

Bei einer Bestrahlung am SIS muß der Probenwechsel automatisch erfolgen. Es ist also ein Auswechseln der Zelle als Ganzes notwendig. Damit der Laserstrahl trotzdem noch justiert ist, muß für eine genaue Platzierung der Zelle gesorgt sein.

Die Messung muß innerhalb von etwa 10 ms abgeschlossen sein. Nach 10 ms ist nur noch manifestierter Schaden meßbar. Da eine Messung 2 ms dauert, kann eine Probe bestenfalls fünf Meßpunkte liefern. Pro Meßpunkt sind, je nach Rauschanteil, fünf bis acht Einzelmessungen notwendig. Bei einer Abtastung im Abstand von Millisekunden sind also 10-20 Proben zu messen, die mit der gleichen Dosis bestrahlt wurden. Eine genaue Kontrolle der Dosis ist Voraussetzung, um eine einigermaßen lückenlose Aufnahme der Schadensentwicklung zu erhalten. Die tatsächlich applizierte Dosis läßt sich durch elektrooptische Messung des manifestierten Schadens bestimmen.

Literaturverzeichnis

- [WeDo78] : A.Wegener, R.Dowden, V.Koester
J. Chem. Phys. 70 , 1979, 622
- [Stell] : N.Stellwagen
Biopolymers 20, 1981 , 399
- [Hag81] : P. Hagermann
Biopolymers 20, 1981 , 1503
- [HaZi81] : P. Hagermann , B. Zimm
Biopolymers 20 , 1981 , 1536
- [Dieketal] : S.Diekmann et al.
Biophys. Chem. 15, 1982 , 157
- [Hear] : J. Hearst
J. Chem. Phys. 38 , 1963 , 1062
- [YaYa73] : H. Yamakawa , J. Yamaki
J. Chem. Phys. 58 , 1971 , 1973
- [EE81] : J. Elias , D. Eden
Macromolecules 14, 1981 , 410
- [Broe] : S. Broersma
J. Chem. Phys. 32 , 1960 , 1626
- [Kirk48] : J. Kirkwood , J. Riseman
J. Chem. Phys. 16 , 1948 , 565
- [Kirk54] : J. Kirkwood
J. Polymer Sci. 12 ,1954 , 1
- [YY80] : T. Yoshizaki , H. Yamakawa
J. Chem. Phys. 72, 1980 , 57
- [Hoppe] : W. Hoppe , W. Lohmann, H. Markl , H. Ziegler
Biophysik , Springer Verlag
- [Lasko] : W. Laskowski , W. Pohlitz
Biophysik , Georg Thieme Verlag
- [Ngo] : F. Ngo , E. Blakely , C. Tobias
Rad. Res. 87, 1981 , 5978



An dieser Stelle möchte ich danken

meinen Eltern , die mir das Studium ermöglichten .

Prof. R. Neumann , der die Betreuung der Arbeit übernahm .

Dr. G. Kraft für die Betreuung der biophysikalischen Seite der Arbeit .

Dr. Th. Kühl für die Unterstützung bei Planung und Durchführung .

der Gruppe Biophysik für die Unterstützung bei allen auftretenden biologischen Fragen .

der Abteilung Elektronik-Experimente für die Hilfe bei den verschiedensten elektronischen Problemen .

Dr. S. Glückert für die temporäre Überlassung eines Rechners .

H. Keller für die Hilfe bei Goosy und Co.

M. Scholz für die hilfreichen Diskussionen und Korrekturlesen der Arbeit .

ganz besonders F. Kraske für die zeitaufwendige und nervenaufreibende Programmierung der Datenauslese und stetes Interesse an meiner Arbeit .

A. Wörner für die Unterstützung bei der Beendigung der Arbeit .

