

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

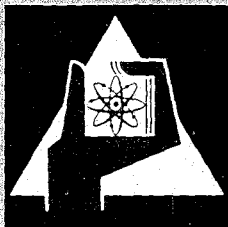
Juli 1968

KFK 784

Institut für Strahlenbiologie

Brüche und Vernetzungen in bestrahlter
Desoxyribonukleinsäure von Bakteriophagen

L. Bohne



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Juli 1968

KFK 784

Institut für Strahlenbiologie

Brüche und Vernetzungen in bestrahlter
Desoxyribonukleinsäure von Bakteriophagen

Leuthold Bohne

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>1. Einleitung</u>	1
<u>2. Material und Methoden</u>	7
<u>2.1. Gewinnung der Phagen</u>	7
2.1.1. Stammlösungen	7
2.1.2. Mikroorganismen	8
2.1.3. Herstellung der Phagensuspensionen	8
2.1.4. Titrieren der Phagen	11
<u>2.2. DNA-Isolierung</u>	11
<u>2.3. Charakterisierung der DNA-Präparationen</u>	12
2.3.1. Bestimmung der Konzentration	12
2.3.2. Bestimmung des Proteingehaltes	14
<u>2.4. Handhabung der Lösungen</u>	14
<u>2.5. Bestrahlung</u>	15
2.5.1. Bestrahlung von DNA-Lösungen	15
2.5.2. Bestrahlung der Bakteriophagen	15
<u>2.6. Untersuchungsmethoden zur Molekulargewichtsbestimmung</u>	15
2.6.1. Viskositätsbestimmungen	15
2.6.2. Sedimentationsanalysen	18
<u>2.7. Schmelzpunktbestimmung und Renaturierung</u>	21
<u>3. Ergebnisse</u>	22
<u>3.1. Molekulargewichtsbestimmung und Darstellung von Sedimentations- und Molekulargewichtsverteilungen</u>	22
3.1.1. Mittleres Molekulargewicht aus $S_{0,5}^0$ und $[\eta]$	22
3.1.2. Sedimentationsverteilung	23
3.1.3. Molekulargewichtsverteilung	26

	Seite
<u>3.2. Molekulargewicht und Molekulargewichtsver-</u> <u>teilung von Phagen-DNA nach Bestrahlung</u> <u>in vitro</u>	28
3.2.1. Unbestrahlte Phagen-DNA	28
3.2.2. Veränderungen der DNA-Struktur nach Bestrahlung in Lösung	29
3.2.3. Bestimmung der Zahl der Brüche und der Ver- netzungen	30
3.2.4. Die Wirkung von Sauerstoff auf DNA-Lösungen während der Bestrahlung	34
<u>3.3. Veränderungen der DNA bestrahlter Phagen</u>	35
3.3.1. Phageninaktivierung	35
3.3.2. Bestimmung der Bruchrate aus den Gradienten der Sedimentation	38
3.3.3. Sedimentationsverteilungen	41
3.3.4. Molekulargewichtsverteilungen, Bestimmung der Zahl der Brüche und Vernetzungen	43
<u>3.4. Schmelzpunkt und Renaturierung unbestrahlter</u> <u>und bestrahlter DNA-Lösungen</u>	45
3.4.1. Schmelzpunkt und Renaturierung unbestrahlter DNA-Lösungen verschiedener Herkunft	45
3.4.2. Schmelzpunkt und Renaturierung bestrahlter DNA-Lösungen	47
3.4.3. Schmelzpunkt und Renaturierung von DNA bestrahlter Phagen	48
<u>4. Diskussion</u>	49
<u>4.1. Beschreibung der Methode der Molekulargewichts-</u> <u>bestimmung und der Aufstellung von Sedimentations-</u> <u>und Molekulargewichtsverteilungen</u>	51
4.1.1. Molekulargewichtsbestimmung	51
4.1.2. Sedimentations- und Molekulargewichtsver- teilungen	52
<u>4.2. Bestimmung der Zahl der Brüche und der Ver-</u> <u>netzungen nach Bestrahlung in wässriger Lösung</u>	54

	Seite
<u>4.3. Beschreibung der strahlenbedingten Veränderungen von DNA bestrahlter Phagen in Beziehung zur biologischen Aktivität</u>	59
4.3.1. Die biologische Inaktivierung	59
4.3.2. Die Bestimmung von Doppelbrüchen und Vernetzungen aus dem Gradienten	60
4.3.3. Die Bestimmung von Doppelbrüchen und Vernetzungen aus den Molekulargewichtsverteilungen	61
4.3.4. Kritik der Auswertung	63
4.3.5. Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse	65
<u>4.4. Untersuchungen über indirekte und direkte Strahlenschädigungen der Wasserstoffbrücken</u>	66
4.4.1. Schmelz- und Renaturierungsverhalten von DNA verschiedener Herkunft	66
4.4.2. Schmelz- und Renaturierungsverhalten bestrahlter DNA-Lösungen und von DNA bestrahlter Phagen	70
<u>5. Zusammenfassung</u>	72
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	74
<u>7. Tabellen und Abbildungen</u>	81

1. Einleitung

Die Wirkung ionisierender Strahlen auf biologische Objekte kann formal durch Dosiseffektkurven beschrieben werden. Hierbei wird der biologische Schaden mit dem Betrage der absorbierten Strahlenenergie in Beziehung gesetzt. Eine tiefergehende Analyse dieser Kurven wurde besonders bei Bakterien und Viren durchgeführt, wobei die Zerstörung der Koloniebildungsfähigkeit der bestrahlten Organismen als biologischer Effekt der Strahlung gewertet wurde. Diese Analysen führten zur Entwicklung der Treffer- und Treffbereichstheorie (Lea 1946, Timoféeff-Ressovsky und Zimmer 1947), die als wirksames Prinzip der Strahlung konkrete Ereignisse der Energieabsorption in einem empfindlichen Volumen des bestrahlten Organismus wahrscheinlich machten.

Weitere strahlenbiologische Arbeiten versuchten, die auf die Energieabsorption folgenden Prozesse näher zu beschreiben. Dabei interessierten einmal die unmittelbar daran anschließenden physiko-chemischen Reaktionen - meist Radikalreaktionen - zum anderen die später erreichten stabilen Veränderungen einzelner Moleküle. Diese molekularen Veränderungen führen über zahlreiche biochemische und biologische Reaktionen zu dem beobachtbaren Strahleneffekt am biologischen Objekt.

Bei Mikroorganismen, insbesondere bei den Viren, haben zahlreiche Untersuchungen gezeigt, daß die Veränderungen der molekularen Struktur der Desoxyribonukleinsäure (DNA) eine wesentliche Ursache der Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit ist (Davis 1953, Hotz und Zimmer 1963). In der vorliegenden Untersuchung sollen nun einige strahlenbedingte molekulare Veränderungen in der DNA von Bakteriophagen beschrieben werden und versucht werden, diese in Beziehung zu dem biologischen Effekt der Strahlung zu setzen.

Eine Analyse der strahlenbedingten molekularen Veränderungen der DNA beginnt zweckmäßig mit Untersuchungen von Verände-

rungen, die nach Bestrahlung der DNA in verdünnter, wässriger Lösung beobachtet werden. Die dabei im Wasser entstehenden Radikale wirken auf die DNA ein. Man bezeichnet dies als indirekte Strahlenwirkung. Bei Bestrahlung von Bakterien oder Viren führt hauptsächlich die im DNA-Molekül selbst absorbierte Strahlenenergie zu den molekularen Veränderungen (direkte Strahlenwirkung). Obwohl hier die an die Energieabsorption anschließenden Radikalreaktionen viel weniger bekannt sind, ist es doch aussichtsreich, die darauf eintretenden molekularen Veränderungen der DNA zu analysieren und mit denen nach indirekter Bestrahlung zu vergleichen.

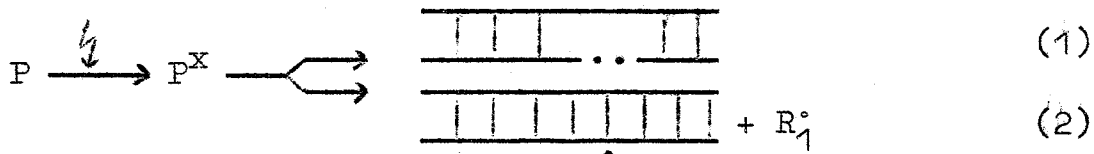
Als Wirkung ionisierender Strahlung auf die DNA in wässriger Lösung beobachtete man chemische Veränderungen der Nukleotidbasen (Weiss 1964), Brüche der Doppelhelix und des einzelnen Nukleotidstranges (Butler 1956, Peacocke 1960, Hagen 1967), Vernetzungen zwischen den einzelnen Molekülen (Alexander und Lett 1960, Hagen und Wellstein 1965) sowie eine Schädigung der Wasserstoffbrücken (Cox u.a. 1958, Hagen und Wild 1964).

Die Veränderungen der makromolekularen Struktur der DNA, also Brüche, Vernetzungen und Spaltung der Wasserstoffbrücken sind dabei am empfindlichsten zu messen, während dagegen detaillierte chemische Analysen an einzelnen Bausteinen im betrachteten Makromolekül weniger aussichtsreich sind. Schematisch kann man die Strahlenreaktionen an der Nukleotidkette wie folgt beschreiben:

Betrachten wir die DNA als Polymer P, so können wir die Reaktionen, die an synthetischen Polymeren nach Bestrahlung auftreten (Henglein und Schnabel 1966), formal auf die DNA übertragen. Dabei müssen wir berücksichtigen, daß die DNA aus zwei polymeren Einzelsträngen besteht.

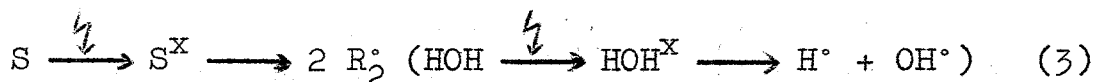
Je nach der Konzentration der DNA bei der Bestrahlung wird ein Teil der Strahlenenergie direkt an der DNA-Doppelhelix absorbiert werden (direkte Strahlenwirkung). Dabei kann

einmal einer der beiden Doppelstränge aufgespalten werden, wodurch zwei Radikalstellen entstehen (1) oder es wird eine Seitengruppe als Radikal abgetrennt, wobei nur eine Radikalstelle am DNA-Molekül zurückbleibt (2):

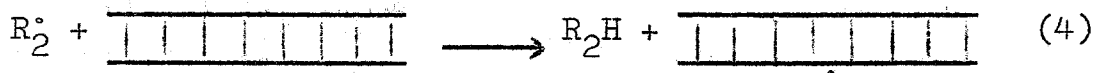


Hierin bedeutet P^X der aktivierte Zustand des Polymers, die Punkte sollen die Radikalstellen andeuten.

Ein anderer Teil der Energie wird auf das Lösungsmittel S übertragen werden. Bei verdünnten Lösungen überwiegt dieser Anteil:



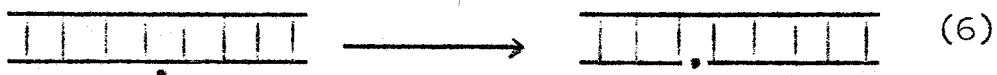
Die Lösungsmittelradikale (diffusible Agentien) können nun zur DNA diffundieren und hier die Bildung von Makroradikalen induzieren, indem sie mit einer Seitengruppe (z.B. H) rekombinieren.



Das entstandene Makroradikal kann verschieden weiterreagieren. Es kann mit einem Lösungsmittelradikal rekombinieren, wodurch ein unversehrtes Molekül zurückgebildet wird:

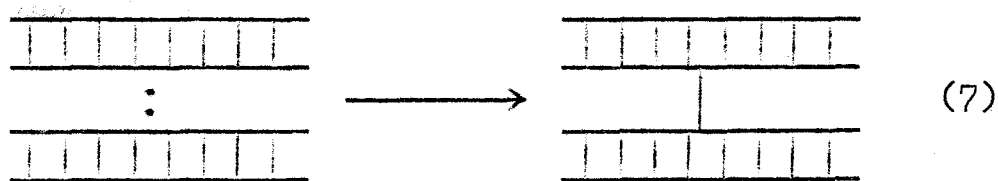


oder aber es kann an der Radikalstelle eine Einzelkette brechen (Einzelbruch), wobei eine Radikalstelle zurückbleibt:



Die Radikalstelle wird dann mit einem Lösungsmittelradikal rekombinieren. Liegt im zweiten Einzelstrang ebenfalls eine Radikalstelle gegenüber oder in nicht zu weiter Entfernung vor, so kann sich die Reaktion in diesem Strang wiederholen, womit es zu einem Doppelbruch kommen würde. Dabei würden die zwischen den beiden Radikalstellen liegenden Wasserstoffbrücken aufgespalten.

Es ist aber auch eine Reaktion zwischen zwei benachbarten Makroradikalen denkbar, bei der zwei Doppelhelices zu einem neuen, vernetzten Molekül rekombinieren (Vernetzung):



Es entsteht in diesem Falle ein Molekül mit höherem Molekulargewicht. Allerdings werden gleichzeitig eintretende Brüche je nach ihrem Verhältnis zu den Vernetzungen die Kinetik der Veränderungen des Molekulargewichtes beeinflussen (Henglein und Schnabel 1966). Alle diese Reaktionen beschreiben nur die makromolekularen Veränderungen, die sich auf Brüche oder Vernetzungen beziehen. Es sollte hier nicht darauf eingegangen werden, wo die Radikalstellen am DNA-Gerüst der Phosphat-Esterbindung entstehen und wie der chemische Mechanismus von Brüchen oder Vernetzungen im einzelnen abläuft. Hierüber ist noch sehr wenig bekannt.

Nach einer Bestrahlung in vivo konnte eine Schädigung der DNA zunächst durch den Verlust ihrer Fähigkeit der Transformation genetischer Merkmale nachgewiesen werden (Hutchinson und Arena 1960, Stuy 1961). Dagegen gelang der Nachweis chemischer oder physikalisch-chemischer Veränderungen nicht überzeugend, da hierfür die Organismen sehr hoch bestrahlt werden mußten, um die Schäden überhaupt meßbar erfassen zu können. Sekundäre Folgereaktionen, d.h. stoffwechselbedingte Reaktionen an der DNA, konnten nicht

ausgeschlossen werden, zudem führte häufig schon die Isolierung der DNA allein zu einer Schädigung ihrer Struktur (Thomas und Berns 1961).

Erst seit kurzer Zeit kennt man Verfahren, DNA aus Mikroorganismen so schonend zu isolieren, daß eine Aussage über die in vivo eingetretenen Veränderungen möglich war. So untersuchte z.B. Kaplan (1966) das Auftreten von Einzel- und Doppelbrüchen in der DNA bestrahlter Bakterienzellen und erkannte Doppelbrüche als Ursache des letalen Effektes ionisierender Strahlen. Von Freifelder (1965) wurde die Häufigkeit von Doppelbrüchen in der DNA des Phagen T7 mit der Vermehrungsrate verglichen. Nach Bestrahlung in 10^{-3} m Histidinlösung, in der nur direkte Strahlenwirkungen auftreten, wurden etwa 0,4 Doppelbrüche pro inaktiviertem Phagen gefunden. Es wird hier deutlich, daß Doppelstrangbrüche nicht die alleinige Ursache der Phageninaktivierung sein können. Es erschien deshalb angebracht, die Phageninaktivierung und die dabei eintretenden Veränderungen der makromolekularen Struktur der DNA eingehender zu untersuchen.

Die auch von anderen Autoren verwendeten Bakteriophagen als Objekt strahlenbiologischer Untersuchungen bieten in vielerlei Hinsicht große Vorteile. Bei differenzierteren Objekten, wie z.B. Bakterien- oder Säugetierzellen, macht eine Vielzahl stoffwechselbedingter Parameter eindeutige Aussagen über die primären Strahlenschäden der DNA nahezu unmöglich. Da Phagen keinen eigenen Stoffwechsel besitzen, wird bei diesen die Interpretation primärer Schäden erleichtert. Daneben lassen sie sich relativ einfach in großen Mengen züchten und biologisch testen. Besonders günstig ist, daß die DNA aller Partikel die gleiche Molekülgröße besitzen, womit ein homogenes Untersuchungsmaterial vorliegt. Auch sind die Molekulargewichte von Phagen-DNA noch nicht zu hoch, so daß eine schonende Isolierung ohne mechanische Degradierung noch gewährleistet werden kann.

Als Objekt unserer Untersuchungen wählten wir T1-Bakteriophagen, deren Strahlenempfindlichkeit schon gut untersucht ist (Hotz 1966). Die DNA dieser Phagen hat ein Molekulargewicht von ca. $30 \cdot 10^6$. Wir entwickelten und verfeinerten zunächst ein Isolierungsverfahren, das zu guten Ausbeuten an DNA mit wenig gebrochenen Molekülen führte. Zum Vergleich isolierten wir DNA aus T4-Phagen mit einem Molekulargewicht von etwa $120 \cdot 10^6$, um unser Isolierungsverfahren zu prüfen und die Methode unserer Molekulargewichtsbestimmungen mit den Ergebnissen anderer Autoren vergleichen zu können.

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst die Bestimmung des Molekulargewichtes sowie die Analyse der Molekulargewichtsbestimmung dargestellt werden. Um eine sichere Aussage über Molekülform und Molekulargewicht machen zu können, wurde neben der Sedimentation in der analytischen Ultrazentrifuge auch die Viskosität gemessen. Schädigungen der Wasserstoffbrückenbindungen charakterisierten wir mit Schmelzpunktbestimmungen und Renaturierungsversuchen. Mit diesen Methoden werden die Veränderungen der DNA nach Bestrahlung in wässriger Lösung, also unter indirekter Strahlenwirkung, beschrieben. Dabei galt unser Interesse den Doppelstrangbrüchen, den eventuell auftretenden Vernetzungsreaktionen und den Schädigungen der Wasserstoffbrücken.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte versucht werden, in entsprechender Weise die direkte Strahlenwirkung auf die DNA in den Bakteriophagen zu beschreiben. Damit sollte ein Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus geleistet werden, der für den Verlust der Koloniebildungsfähigkeit der Phagen verantwortlich ist.

2. Material und Methoden

2.1. Gewinnung der Phagen

2.1.1. Stammlösungen

Medium M-9: Es wird in Form von 4 sterilen Stammlösungen angesetzt: Lösung A enthält 178,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und 75 g KH_2PO_4 in 1 l aqua bidest.; Lösung B besteht aus 100 g NH_4Cl , 50 g NaCl und 20 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ pro 1 l und Lösung C aus 44 g Glucose und 0,3 g KH_2PO_4 in 100 ml aqua bidest.. Lösung D ist eine 0,27 %ige wässrige $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung. Lösung A und B werden autoklaviert, Lösung C und D werden bei 100° im Dampftopf sterilisiert. 1 l des M9-Mediums setzt sich aus 40 ml A, 10 ml B, 10 ml C, 0,1 ml D und 940 ml sterilem aqua bidest. zusammen.

Phagenpuffer: Der Puffer setzt sich zusammen aus: 7,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; 1,5 g KH_2PO_4 ; 4,0 g NaCl ; 5,0 g K_2SO_4 ; 1,0 ml 1 % Gelatinelösung. Die Mischung wird mit destill. Wasser zu 1000 ml gelöst und im Dampftopf sterilisiert. Vor Gebrauch des Puffers werden noch 0,5 ml 0,1 m $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung und 0,5 ml 0,01 m CaCl_2 -Lösung zugesetzt. Die fertige Lösung soll pH 7 haben.

Indikator-Nährboden nach Bresch (1952): Er enthält in 1 l 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto Extrakt, 0,5 g NaCl und 15 g Bacto Agar. Nach Neutralisierung und Autoklavieren werden zu 1 l Medium 40 ml 40 %ige Glucose-Lösung 32 ml 0,1 %iger Alizarin-Gelb-Lösung und 7 ml 1 %iger Wasserblau-Lösung gegeben. Danach wird die heiße Lösung in sterile Petrischalen ausgegossen.

T-Brühe: Die T-Brühe (Trypton-Brühe) enthält in 1 l destill. Wasser 10 g Pepton aus Fleisch (tryptisch verdaut), 5 g NaCl , 1 ml 1 m MgSO_4 -Lösung. Die auf pH 7 eingestellte Lösung wird autoklaviert.

2.1.2. Mikroorganismen

Die für unsere Versuche verwendeten T1- und T4-Coliphagen und ihre Wirtsstämme *Escherichia coli* B wurden unserem Institut 1958 vom Institut für Genetik der Universität Köln zur Verfügung gestellt und als Laborstämme in Passagen weitergeführt.

Bakterienstämme sowie Lysate wurden in Difco-Nährmedium nach der von Adams (1950) beschriebenen Methodik angesetzt. Die Lysate und Konzentrate, die durch einige Tropfen Chloroform konserviert wurden, bewahrten wir bei 4 °C auf. Erst zum Zeitpunkt der Isolierung der DNA bzw. der Bestrahlung wurden die Phagen im entsprechenden Puffer oder Bestrahlungsmedium verdünnt.

2.1.3. Herstellung der Phagensuspensionen

Um für unsere Untersuchungen ein homogenes Material verwenden zu können, empfahl es sich, möglichst nur Phagen aus ein und derselben Präparation zu verwenden. Das machte die Präparation größerer Mengen hochgereinigter Phagensuspensionen notwendig. Wir bedienten uns eines rationalen Verfahrens von Hotz (1966), das die Züchtung in großen Kulturgefäßen von 20 l ermöglicht. Das verwendete Medium M-9 für die Wirtsbakterien war ein Minimalmedium, das als einzige Energiequelle für die Bakterien Glucose enthält.

Zunächst werden 150 ml M-9-Medium mit 0,3 ml einer über Nacht belüfteten *E. coli* B Kultur in M-9 angeimpft. Diese Kultur läßt man über Nacht bei 37° unter starker Belüftung wachsen. Die Suspension wird dann in 20 l M-9 von 37° gegeben. Diese Großkultur läßt man wiederum unter starker Belüftung bis zu einer Zellzahl von etwa $5 \cdot 10^8$ Bakterien/ml wachsen. Die Zählung der Keime erfolgte in einer Blutkörperchen-Zählkammer. Die Bakterienkultur wird nun mit Phagen aus einem frischen, d.h. nicht mehr als 6 Tage alten Lysat angeimpft. Die Infektionszahl, das ist die mittlere Anzahl von Impfphagen pro Bakterium, soll etwa 0,5 betragen.

Etwa 20 min nach Zugabe der Impfphegen beginnt in diesem Kultursystem die Lysis der Bakterien, wobei der Zellinhalt der zerstörten Bakterien in Lösung geht. Die Belüftung dieser eiweißhaltigen Lösung zieht eine starke Schaumbildung nach sich. Dieser Schaum wird mittels eines von Hotz (1966) entwickelten Schaumkondensators wieder zu flüssigem Nährmedium zerschlagen, welches in das Kulturgefäß zurückfließt. Mit dieser Methode erübrigte sich die Zugabe chemischer Antischaummittel, die nach unserer Erfahrung den Titer senken. Der Titer des fertigen Großlysates beträgt nach etwa 18 Stunden $5 \cdot 10^{10} - 10^{11}$ Phagen pro ml. Setzt man zum Großlysate etwa 0,5 l Chloroform zu, so platzen die kurz vor der Lysis stehenden Zellen. Hierdurch kann der Endtiter nochmals etwas erhöht werden.

Das Großlysate wird nun in 4 l-Anteile aufgeteilt, pro Anteil 1120 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 100 ml 0,1 m Äthylendiamintetraacetat-Lösung zugesetzt und 72 Stunden bei 4°C stehengelassen. Durch die Salzzugabe präzipitieren die Bakterienhüllen zusammen mit den Phagen und setzen sich am Boden des Gefäßes ab. Der Überstand wird abgesaugt und nach einer Titerkontrolle verworfen. Die Präzipitate werden bei 9000 Upm 1 Stunde lang abzentrifugiert und die Niederschläge in etwa 300 ml Phagenpuffer resuspendiert. Um die Viskosität der Suspension herabzusetzen und um die DNA, die RNA und das Protein der Bakterien zu verdauen, wird die Mischung für 20 Minuten bei 37°C mit DNase, RNase (je $1 \mu\text{g/ml}$) und Trypsin ($2 \mu\text{g/ml}$) unter Zusatz von 0,1 ml gesättigter MgSO_4 -Lösung pro 100 ml inkubiert. Anschließend werden die verbleibenden Bakterienhüllen durch einstündige Zentrifugation bei 6000 Upm von den Phagen getrennt. Die im Überstand befindlichen Phagen werden nun durch Zentrifugation bei 15 000 Upm sedimentiert und in Phagenpuffer resuspendiert.

Die letzte Reinigung erfolgt mit Hilfe des CsCl-Gradienten. Eine Phagensuspension mit Zusatz von 0,67 g CsCl/ml wird in Zellulosezentrifugenröhrchen 20 h bei 35 000 Upm im Rotor 40 der präparativen Zentrifuge der Fa. Beckman (Spinco L 50) zentrifugiert. In dem sich dabei ausbildendem CsCl-Dichtegradienten sammeln sich die Phagen entsprechend ihrer Dichte ($\rho = 1,49$) etwa in der Mitte des Röhrchens als opaleszierendes Band, während sich das restliche Eiweiß als braune gelatinöse Masse an der Oberfläche der Flüssigkeit befindet. Die Zelluloseröhrchen werden nun von unten mit einer Kanüle angestochen, so daß die Lösung austropfen kann. Die Phagenbänder werden gesammelt, die übrigen Lösungen verworfen. Die vereinigten Phagenfraktionen müssen nun wieder vom CsCl befreit werden. Dies geschieht durch Dialyse gegen Phagenpuffer, wobei während 72 Stunden der Puffer dreimal gewechselt wird. Die Aktivitätsausbeute hängt in erster Linie vom Ausgangstiter des Lysates ab, d.h. je höher der Titer, desto geringer sind die während der Aufarbeitung auftretenden Aktivitätsverluste. Jedoch ist bei Lysaten mit vergleichbarem Titer bei völlig gleicher Aufarbeitungsmethode die Ausbeute sehr variabel. Sie schwankt zwischen 20 und 90 % der Ausgangsaktivität.

Die hier beschriebene Aufarbeitungsmethode gilt für den schockresistenten T1-Phagen. Er ist gegen größere Veränderungen des osmotischen Druckes unempfindlich, so daß er durch Aussalzen mit hohen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen angereichert und mit dem CsCl-Gradienten gereinigt und konzentriert werden kann. T4-Phagen sind nicht schockresistent und würden beim Aussalzen und Reinigen im Dichtegradienten platzen und ihre DNA freisetzen. Man ist hier darauf angewiesen, die Phagen vom Bakterieneiweiß durch fraktionierende Zentrifugation zu trennen.

2.1.4. Titrieren der Phagen

T1-Phagen plattierten wir auf einem Indikator-Nährboden nach Bresch (1952): 0,1 ml einer in geeigneter Weise in T-Brühe verdünnten T1-Suspension wird mit etwa der gleichen Menge einer Übernachtskultur von E.coli B gleichmäßig über die Agarschicht verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

T4-Phagen wurden mit der top-layer-Methode nach Adams (1959) titriert. Von jeder Probe wurden mindestens zwei Platten ausgezählt, die Verdünnung wurde dabei so gewählt, daß etwa 300 - 400 plaques gezählt werden konnten.

2.2. DNA-Isolierung

Die Isolierung von Phagen-DNA erfolgte nach der Methode von Mandell und Hershey (1960) mit Phenol: Zu einer T1-Phagensuspension (Phagentiter etwa $2 \cdot 10^{12}$ Phagen/ml in Trispuffer pH 7) wurde Natriumdodecylsulfat (Endkonzentration 2 %) zugegeben (Subirana 1965), um die Abtrennung des Proteins zu erleichtern. Anschließend wurde die Suspension bei 4 °C zwei bis drei mal mit dem gleichen Volumen frisch destilliertem, wassergesättigten Phenol versetzt und vorsichtig mit der Hand geschüttelt. Die Phenolschicht wurde jeweils durch kurze niedrigtourige Zentrifugation abgetrennt und mit einer Spritze entfernt. In dieser (unteren) Phenolschicht befindet sich das Phagenprotein. Nach der letzten Extraktion wurde das restliche in der wässrigen Phase gelöste Phenol durch vorsichtiges Schütteln mit frischem Äther solange extrahiert (etwa 6 mal), bis die DNA-Lösung klar war. Danach wurde die DNA-Lösung 15 h bei 4 °C gegen 0,165 m NaCl pH 7 oder gegen 0,15 m NaCl + 0,015 m Na-Citrat pH 7 dialysiert. Der Dialyseschlauch wurde vorher mit destilliertem Wasser ausgekocht, um Vereunreinigungen mit Stoffen zu vermeiden, die Licht der Wellenlänge 260 nm absorbieren.

Bei dem Versuch aus T4-Phagen (Titer $2 \cdot 10^{12}$ Phagen/ml) DNA auf die gleiche Weise zu isolieren, gelang es uns nach dreimaliger Phenolextraktion nicht, eine einwandfreie Trennung von Protein und DNA zu erzielen. Beim Abzentrifugieren der Phenolschicht bildete sich zwischen wässriger Schicht und Phenolschicht eine dicke visköse Zwischenphase, die sich sehr schlecht von der wässrigen Schicht abtrennen ließ. Erst durch Suspension der Phagen in 1 m NaCl pH 7 und nach Zugabe von Natriumdodecylsulfat (Endkonzentration 2 - 3 %) ließ sich eine gute Trennung erzielen.

Bei dieser Isolierungsmethode geht etwa 20 % - 30 % der zu erwartenden DNA-Menge verloren. So ist z.B. der angenäherte DNA-Gehalt pro T4-Phage $2,15 \cdot 10^{-16}$ g/Partikel. Bei einem Titer von $2 \cdot 10^{12}$ Partikel/ml würde man ~ 500 μ g/ml DNA erwarten. Die von uns bei mehreren Isolierungsprozessen der DNA gefundene Menge schwankte zwischen 350 und 420 μ g/ml. In diese Überschlagsrechnung ist jedoch nicht die DNA-Menge eingerechnet, die von den auch vorhandenen nicht infektiösen Bakteriophagen stammt.

2.3. Charakterisierung der DNA-Präparationen

2.3.1. Bestimmung der Konzentration

Da in der DNA Basen, Zucker und Phosphatgruppen in äquimolarem Verhältnis vorliegen, kann man über die quantitative Bestimmung eines Bestandteils die Konzentration ermitteln. Wir wählten den Weg über die Bestimmung des Phosphatgehaltes nach einer Methode von Chen u.a. (1956). 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. Das Reagenz ist nur einen Tag haltbar.

Das organisch gebundene Phosphat muß zunächst in anorganisches Phosphat umgewandelt werden, und zwar mit Magnesiumnitrat in Alkohol. 0,05 ml DNA-Lösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 und 1,0 mg/ml werden mit 0,05 ml 10 %iger alkoholischer $Mg(NO_3)_2$ -Lösung versetzt und solange

erhitzt, bis keine nitrosen Gase mehr entwickelt werden. Das entstandene Ortho-Phosphat wird in 0,3 ml 1 n HCl aufgenommen und 10 min im Wasserbad gekocht. Nach Zugabe von 1,7 ml H₂O wird die Lösung mit 2 ml des Chen-Reagenz versetzt. Dabei wird der entstehende Molybdatkomplex durch die Ascorbinsäure in Gegenwart von Schwefelsäure zu Molybdänblau reduziert. Nach einer Stunde Stehenlassen bei 37 °C hat sich das Maximum der Färbung eingestellt. Die Farbin-tensität wird bei 820 nm photometrisch gemessen und mit einer Standardkurve dieser Reaktion mit KH₂PO₄ verglichen.

Entsprechend der Basenzusammensetzung der T1-DNA beträgt der Anteil des Phosphors am Molekulargewicht 9,93 % und am Molekulargewicht der T4-DNA 9,1 %. Bei Kenntnis des Phosphatgehaltes einer Probe läßt sich daraus auf den DNA-Gehalt pro ml schließen.

Nach sorgfältiger Deproteinisierung (< 3 %) der DNA ge-nügt zur Bestimmung der Konzentration die für die Basen spezifische Absorption bei 260 nm. Der Vergleich von Phosphatgehalt und optischer Extinktion ermöglicht die Bestimmung eines Extinktionsfaktors, mit Hilfe dessen die Konzentration der DNA sehr schnell und zuverlässig bestimmt werden kann. Es seien hier zwei Beispiele einer solchen vergleichenden Bestimmung gegeben:

Von einer Lösung von T1-DNA der Extinktion $E_{260}^{1\text{cm}} = 4,7$ in Phosphat-freiem Puffer wurde aus 20 Proben mit je 0,1 ml nach der beschriebenen Methode der Phosphatgehalt bestimmt. Der Mittelwert ergab eine Extinktion von $E_{820}^{1\text{cm}} = 0,4389$. Das entspricht nach der Eichkurve 21,1 µg Phosphor pro ml oder einem DNA-Gehalt von 212 µg/ml. Hieraus berechnet sich für das Natriumsalz von T1-DNA der Extinktionskoeffi-zient von 19,8 cm²/mg.

Entsprechend wurde für T4-DNA der Extinktion $E_{260}^{1\text{cm}} = 4,885$ ein Mittelwert aus 20 Proben von $E_{820}^{1\text{cm}} = 0,4935$ gefunden. Der Phosphatgehalt war demnach 23,25 µg/ml. Für das Natrium-salz der T4-DNA erhielten wir somit als Extinktionskoeffi-zienten den Wert 18,1 cm²/mg. Beide Werte konnten reprodu-ziert werden.

2.3.2. Bestimmung des Proteingehaltes

Um Fehler bei den physikalisch-chemischen Untersuchungen und bei den Extinktionsmessungen zu vermeiden, sollte der Proteingehalt der Proben 3 % nicht übersteigen. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wählten wir die Methode von Lowry u.a. (1951), die sich für geringe Proteilmengen, wie sie bei unseren DNA-Präparationen vorlagen, besonders gut eignet:

In 0,6 ml einer DNA-Lösung werden 3 ml alkalische Kupfersulfat-Natriumtartrat-Lösung zugesetzt und kräftig geschüttelt. Die Lösung besteht aus 50 ml 2 % Na_2CO_3 in 0,1 n NaOH und 1 ml 0,05 % CuSO_4 + 1 % Natriumtartrat. Nach 10 min wird 0,3 ml phenolisches Folin-Ciocalteu-Reagenz zugefügt und in 1 - 2 sec gemischt. Nach 30 min Reaktionszeit bei Normaltemperatur werden die Proben bei 691 nm photometrisch gemessen. Der Proteingehalt wird durch Vergleich mit einer Standardkurve mit Rinderserumalbumin bestimmt. Nach dreimaliger Phenolextraktion lag der Proteingehalt der DNA zwischen 1 und 3 %.

2.4. Handhabung der Lösungen

T1-DNA mit einem Molekulargewicht von etwa $30 \cdot 10^6$ und besonders T4-DNA mit einem Molekulargewicht von $120 \cdot 10^6$ sind gegen Erwärmung und gegen Scherkräfte sehr empfindlich. Deshalb müssen DNA-Lösungen mit besonderer Vorsicht behandelt werden, um Denaturierung und Degradierung zu vermeiden. Aus diesem Grunde wurden alle Proben stets bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt. Die DNA-Lösungen wurden nicht durch Pipettieren, sondern durch Abwiegen und Eingießen verdünnt. Das Viskosimeter wurde durch Einlaufenlassen der Lösung an der Statorwand und die Zellen der Ultrazentrifuge durch Eingießen der Lösung in das Mittelstück der Zelle gefüllt.

2.5. Bestrahlung

2.5.1. Bestrahlung von DNA-Lösungen

2 - 3 ml einer DNA-Lösung mit einer Konzentration von etwa 200 µg/ml wurden 10 min mit gereinigtem N₂ oder mit O₂ gesättigt und gasdicht verschlossen. Die Bestrahlung erfolgte in einer ⁶⁰Co-γ-Quelle (Atomic Energy of Canada Ltd., "Gammacell 200"). Die Dosisleistung am Ort der Proben entsprach $6,5 \cdot 10^4$ rad/h.

2.5.2. Bestrahlung der Bakteriophagen

Die Phagen (Titer etwa $2 \cdot 10^{12}$ /ml) wurden in 5 % Nährbouillon oder in 0,165 m NaCl + 0,1 m Histidin pH 7 suspendiert und bei 0 °C im Eisbad in einer ⁶⁰Co-γ-Quelle (Atomic Energy of Canada Ltd., "Gammacell 220", $1,6 \cdot 10^6$ rad/h) bestrahlt. Zur Aufnahme der Dosiseffektkurven in beiden Lösungen wurde die Bestrahlung nach jeweils 150 krad unterbrochen und 0,1 ml zum biologischen Test entnommen.

2.6. Untersuchungsmethoden zur Molekulargewichtsbestimmung

2.6.1. Viskositätsbestimmungen

Aus der Viskosität der Lösung η und der Viskosität des Lösungsmittels η_0 ergibt sich die relative Viskosität der Lösung $\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0}$ sowie die spezifische Viskosität $\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$.

Die Grenzviskosität (Staudinger Index) ist definiert:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \lim_{\langle s \rangle \rightarrow 0} \eta_{sp}/c \text{ [dl/g]} \quad (2.1)$$

wobei c die Konzentration der DNA-Lösung in [g/dl] = [g/100 ml] und $\langle s \rangle$ die Scherkraft in [dyn/cm²] bedeuten.

Die Ermittlung der Grenzviskosität erfordert also zwei Extrapolationen:

a) Die Extrapolation gegen die Konzentration $c = 0$. Dies kann man erreichen, indem man $\frac{\eta_{sp}}{c}$ gegen c aufträgt. Bei Extrapolation der Geraden gegen $c = 0$ ergibt sich die Grenzviskosität $[\eta]$. Bei geringen DNA-Konzentrationen ist $\frac{\eta_{sp}}{c}$ konstant. Man kann dann auch η_{sp} gegen c auftragen und aus der Steigung der Geraden die Grenzviskosität ermitteln.

b) Die Extrapolation gegen die Scherkraft Null $\langle s \rangle = 0$. Die Scherkraft trägt der Kraft, die zur Überwindung der inneren Reibung zweier Flüssigkeitsschichten gegeneinander notwendig ist, Rechnung. Bei langen Fadenmolekülen ist die spezifische Viskosität von der Scherkraft abhängig, sie nimmt bei zunehmender Scherkraft ab. Von Crothers und Zimm (1965) wurden entsprechende Untersuchungen an T7- und T2-Phagen-DNA durchgeführt. T7-DNA ist T1-DNA und T2-DNA ist T4-DNA im Molekulargewicht ähnlich. Sie zeigten, daß für T7-DNA erst bei sehr niedrigen Scherkräften von $\langle s \rangle = 4,1 \cdot 10^{-3} \text{ dyn/cm}^2$ und für T4-DNA erst bei $\langle s \rangle = 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ dyn/cm}^2$ keine Abhängigkeit der Viskosität von der Scherkraft mehr zu beobachten ist.

Unsere ersten Viskositätsmessungen an T4-DNA nahmen wir in einem nach Aten und Cohen (1965) modifizierten Ubbelohde-Viskosimeter vor, welches mit einem zylindrischen Rohr mit Millimetereinteilung versehen war (Abbildung 1a). Das Kapillarviskosimeter hatte folgende Abmessungen:

Kapillarlänge $L = 38 \text{ cm}$

Kapillarradius $R = 0,023 \text{ cm}$

Ist die jeweilige Höhe des Flüssigkeitsmeniskus h' und h_0 der Gleichgewichtsstand der Flüssigkeit in den kommunizierenden Röhren, so ist $h = h' - h_0$ die Höhe der Flüssigkeitssäule über dem Gleichgewichtsstand.

Mit der von Aten angegebenen Gleichung für die mittlere Scherkraft

$$\langle \bar{s} \rangle = \frac{\int_0^R (\Delta p/L)(r/2) 2\pi r dr}{\pi R^2} = \Delta p R/3L \quad (2.2)$$

(Δp Druckdifferenz zwischen zwei Höhen h_1 und h_2)

läßt sich die mittlere Scherkraft in jeder Höhe über dem Gleichgewichtsstand berechnen. Die Messungen ließen sich von $h = 15,4$ cm bis $h = 0,6$ cm über dem Gleichgewichtsstand durchführen. Für $h = 15,4$ cm ist $\langle \bar{s} \rangle = 3,05$ dyn/cm² und für $h = 0,6$ ist $\langle \bar{s} \rangle = 0,119$ dyn/cm².

Nach Aten reicht zwar die Scherkraft $\langle \bar{s} \rangle = 3,05$ dyn/cm² noch nicht aus, um in T4-DNA Brüche zu erzeugen, man sieht aber an der Abbildung 2, daß bei der Scherkraft $\langle \bar{s} \rangle = 0,119$ dyn/cm² die Viskosität von der Scherkraft noch abhängig ist. Deshalb ist bei den Messungen eine Extrapolation auf die Scherkraft Null notwendig.

Wir maßen nun die Viskosität von T4-DNA bei vier verschiedenen Konzentrationen, trugen η_{sp} gegen c auf und extrapolierten jeweils auf die Scherkraft Null. Diese Extrapolation ist sehr schwierig und unsicher, da die Funktion $\eta_{sp} = f(h)$ nicht geradlinig verläuft (Abbildung 2) und die Werte von η_{sp} für kleine Werte von h stark ansteigen. Die Werte für η_{sp} wurden dann gegen c aufgetragen und aus der Steigung der Geraden $[\eta]$ ermittelt. Wir fanden für native T4-DNA den Wert $[\eta] = 321$ [$\frac{dl}{g}$] und für T1-DNA $[\eta] = 134,8$ [$\frac{dl}{g}$].

Da die Extrapolation auf $\langle s \rangle = 0$ unsicher und außerdem die Messungen sehr viel Zeit in Anspruch nehmen, nahmen wir alle weiteren Viskositätsbestimmungen mit dem von Zimm und Crothers (1962) entwickelten Rotationsviskosimeter der Fa. Krannich, Göttingen, vor (Abbildung 1b). Es wurde von uns mit einer automatischen Einrichtung zur Ablesung der Umdrehungszeit des Rotors ausgestattet. Die Autoren

geben folgende Formel zur Ermittlung der auftretenden Scherkräfte an:

$$\langle s \rangle = \pi \Omega \cdot \eta \frac{(R_1 + R_2)}{(R_2 - R_1)} \cdot f(R_1, R_2) \text{ [dyn/cm}^2\text{]} \quad (2.3)$$

- Ω Rotorfrequenz (Umdr/sec)
 η Viskosität in Poise (η für H₂O bei 20 °C 0,01 Poise)
 R_1 Rotorradius in cm
 R_2 Statorradius in cm
 f Korrekturfaktor

$$f(R_1, R_2) = \frac{8R_1^2 \cdot R_2^2}{(R_1 + R_2)^3 (R_2 - R_1)} \cdot \ln \frac{R_2}{R_1} \quad (2.4)$$

Bei unserer Anordnung war

$$\begin{aligned} R_1 &= 0,5 \text{ cm} \\ R_2 &= 0,637 \text{ cm} \\ \Omega &= 1,268 \cdot 10^{-2} \text{ Umdr/sec} \end{aligned}$$

Hieraus ergibt sich nach der angegebenen Formel eine Scherkraft von $\langle s \rangle = 3,2 \cdot 10^{-3} \text{ dyn/cm}^2$.

Diese Scherkraft ist so gering, daß die Viskosität unabhängig von der Scherkraft ist. Eine Extrapolation gegen $\langle s \rangle = 0$ ist deshalb nicht mehr notwendig. Da außerdem die Messungen automatisiert werden konnten, boten die Viskositätsmessungen im Rotationsviskosimeter sehr große Vorteile gegenüber der Verwendung des Kapillarviskosimeters. Für T4-DNA ermittelten wir die Grenzviskosität $[\eta]_{T4} = 320 \text{ [} \frac{dl}{g} \text{]}$ und für T1-DNA $[\eta]_{T1} = 134 \text{ [} \frac{dl}{g} \text{]}$. Die gemessenen Werte für η_{sp}/c zeigten, bei guter Thermostatisierung (auf $\pm 0,02 \text{ }^\circ\text{C}$) bei einer Probe nur geringe Abweichungen, der relative Standardfehler betrug etwa 2,5 % - 3 %.

2.6.2. Sedimentationsanalysen

Neben der Grenzviskosität ist der Sedimentationskoeffizient eine weitere physikalische Größe gelöster Makromoleküle. Der Sedimentationskoeffizient s ist definiert als Sedimentationsgeschwindigkeit eines in Lösung befindlichen Mole-

küls pro Einheit der Zentrifugalbeschleunigung

$$s = \frac{dr/dt}{\omega^2 \cdot r} \quad (2.5)$$

hierin ist r der Abstand der Moleküle vom Rotationszentrum (in cm) nach der Zeit t (in sec) und ω die Winkelgeschwindigkeit (in rad/sec).

Die Integration der Gleichung ergibt

$$s = \frac{\ln r_1 - \ln r_0}{\omega^2 (t_1 - t_0)} \quad (2.6)$$

hierin sind r_1 und r_0 die Abstände der Moleküle vom Rotationszentrum nach der Zeit t_1 und zur Zeit $t_0 = 0$.

Die Werte von s sind von der Größe und Form der Moleküle, ihrer Konzentration und von der Zusammensetzung und Temperatur des Lösungsmittels abhängig. Deshalb werden die apparenten s -Werte (s_{app}) auf einen Standard, und zwar auf Wasser von 20 °C bezogen.

$$s_{app,20,w} = s_{app} \cdot FK = s_{app} \cdot \frac{\eta_t^0}{\eta_{20}^0} \cdot \frac{\eta_t}{\eta_t^0} \cdot \frac{1 - V_{20} \cdot \rho_{20}^0}{1 - V_t \cdot \rho_t} \quad (2.7)$$

hierin sind η_t^0 , η_{20}^0 , ρ_{20}^0 Viskosität und Dichte von Wasser bei t^0 und bei 20 °C.

η_t , ρ_t Viskosität und Dichte des Lösungsmittels bei t °C

V_{20} , V_t partielles spezifisches Volumen der gelösten Molekeln bei 20 °C und bei t °C

η_t^0 / η_{20}^0 und η_t / η_t^0 sind tabelliert. Das partielle spezifische Volumen der DNA beträgt nach Oth (1959) = 0,55. Der Einfluß der Konzentration der gelösten DNA wird eliminiert, indem Lösungen verschiedener Konzentration sedimentiert werden. Durch Extrapolation auf unendliche Verdünnung erhält man den Grenzsedimentationskoeffizient s^0 .

Die Sedimentationskoeffizienten werden im folgenden in Svedberg-Einheiten angegeben:

$$1 \text{ S} \equiv 10^{-13} \text{ sec}$$

Die Sedimentationsversuche wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge (Modell Spinco E, Fa. Beckman, München) mit Ultraviolett-optik bei 260 nm und bei $20,0 \pm 0,1$ °C vorgenommen. Die Umlaufgeschwindigkeit betrug nur 15 220 Upm, um eine Aggregation der Moleküle, wie sie bei Aten und Cohen (1965) und Rosenbloom und Schumaker (1967) beschrieben wurde, zu vermeiden. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde entsprechend der Extinktion bei 260 nm so gewählt, daß bei der Belichtungszeit von 20 sec eine lineare Beziehung zwischen der DNA-Konzentration (5 bis 35 µg/ml) und der Filmschwärzung bestand. Die Salzmolarität der Lösung war $0,165 \text{ m Na}^+$ bei pH 7.

Die Intensität der Filmschwärzung wurde mit einem Mikrodensitometer Analytrol (Fa. Beckman) registriert. Für jeden Zentrifugenlauf wurden 10 UV-Aufnahmen im Abstand von 16 min gemacht. Bei dem mit dem Densitometer erhaltenen Gradienten kann zunächst der Abstand des Mittelpunktes des Gradienten x_i bei 50 % der Konzentration ($y_i = 0,5$) für eine Berechnung des Sedimentationskoeffizienten nach Gleichung (2.6) verwendet werden. Dabei ergibt sich der Abstand vom Rotationszentrum r_i durch

$$r_i = x_i \cdot F + 5,7 \text{ (in cm)} \quad (2.8)$$

wobei F ein durch die verwendete Zentrifuge gegebener Vergrößerungsfaktor ist. Man erhält dann $S_{\text{app},20,w,0,5}$, das im folgenden nur mit $S_{\text{app},0,5}$ bezeichnet wird. Ebenso kann auch der Sedimentationskoeffizient für einen beliebigen Punkt des Gradienten x_i, y_i berechnet werden. Man erhält dann $S_{\text{app},i}$. Beispiele werden später gegeben (vgl. Abbildung 4).

2.7. Schmelzpunktbestimmung und Renaturierung

Wird eine DNA-Lösung langsam erwärmt, so trennen sich die beiden Einzelstränge der DNA-Helix unter Aufbrechen der sie verbindenden Wasserstoffbrücken. Die Trennung der Stränge äußert sich in einer Absorptionserhöhung bei 260 nm. Die Temperatur, bei der 50 % der maximal erreichbaren Absorptionserhöhung erreicht ist, nennt man den Schmelzpunkt (T_m) der DNA. Er kann als Kriterium für die Stabilität der Wasserstoffbrücken gelten.

Bei langsamen Abkühlen der DNA-Lösung lagern sich die Einzelstränge der Helix zum Teil wieder zur Doppelhelix zusammen. Dieser Vorgang wird als Renaturierung bezeichnet. Schmelzpunktbestimmung und Renaturierung unserer DNA-Lösungen nahmen wir in einer durch einen Aluminium-Block kontinuierlich aufheizbaren Quarzküvette im Spektralphotometer (Fa. Zeiss) (Aufheizgeschwindigkeit 1,8 °C/min) vor. Die Absorption während des Erwärmens von 25 - 95 °C wurde von einem Schreiber registriert. Durch Ausmessen der erhaltenen Schmelzprofile konnten wir den Schmelzpunkt T_m der Proben ermitteln. Die Renaturierung verfolgten wir durch die Absorptionsabnahme während des Abkühlens der Lösung von 95° auf 25 °C innerhalb von ca. 120 min. Da Schmelzpunkt und Renaturierung von der Salzmolarität abhängig sind, untersuchten wir unsere Lösungen in der für diese Untersuchungen üblichen Salzmolarität 0,165 m (Standard Saline Citrat SSC = 0,15 m NaCl + 0,015 m Na-Citrat pH 7). Die Schmelzprofile der in vitro-bestrahlten Proben wurden im Bestrahlungsmedium, also in 0,165 m NaCl-Lösung aufgenommen. Die Schmelzkurven unbestrahlter Kontrollen sind in SSC als auch in 0,165 m NaCl nicht voneinander verschieden.

3. Ergebnisse

3.1. Molekulargewichtsbestimmung und Darstellung von Sedimentations- und Molekulargewichtsverteilungen

3.1.1. Mittleres Molekulargewicht aus $S_{0,5}^0$ und $[\eta]$

Wie oben erwähnt, sind die Sedimentationswerte von der Konzentration abhängig, der S^0 -Wert muß durch Extrapolation der $\frac{1}{S_{app, 0,5}}$ - Werte gegen die Konzentration $c_A = 0$ bestimmt werden. Bei den folgenden Sedimentationsanalysen soll die Ausgangskonzentration der Lösung jeweils mit c_A bezeichnet werden. Zur Ermittlung der mittleren Sedimentationskonstanten $S_{app, 0,5}$ wurden die mit dem Densitometer erhaltenen Gradienten für verschiedene Konzentrationen einer einzelnen Probe ausgewertet. Meist wurden 5 - 6 Konzentrationen im Bereich von 5 - 40 $\mu\text{g/ml}$ untersucht. Die reziproken Werte von $S_{app, 0,5}$ wurden gegen die Konzentration aufgetragen und auf $c_A = 0$ extrapoliert. Um bei dieser Extrapolation sicherzugehen, wurde $S_{0,5}^0$ nicht graphisch ermittelt, sondern mittels Regressionsanalyse berechnet.

Abbildung 3 zeigt z.B. die Extrapolation von $1/S_{app, 0,5}$ gegen $c_A = 0$ für eine unbestrahlte DNA-Probe (geschlossene Symbole) und die Auftragung von η_{sp} gegen die Konzentration c .

Mit dem so erhaltenen $S_{0,5}^0$ -Wert und dem für dieselbe Probe ermittelten Wert der Grenzviskosität $[\eta]$ wurde nach einer Gleichung von Mandelkern u.a. (1952) das Molekulargewicht $M_{s\eta}$ der DNA-Proben ermittelt. Die Autoren entwickelten eine Beziehung zwischen S^0 , $[\eta]$ und dem Molekulargewicht M , die für den Bereich von $M = 0,30 \cdot 10^6$ bis $130 \cdot 10^6$ gültig ist:

$$M_{s\eta}^{2/3} = \frac{S^0 \cdot [\eta]^{1/3} \cdot N \cdot \eta_0 \cdot 10^{-13}}{\beta (1 - \bar{v}\rho)} \quad (3.1)$$

Es ist hierin:

M = Molekulargewicht

S° = Sedimentationskoeffizient bei unendlicher Verdünnung

$[\eta]$ = Grenzviskosität der Lösung

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

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

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

N = $6.0235 \cdot 10^{23}$

β = $2,5 \cdot 10^6$

Der Wert β ist ein experimenteller Koeffizient, der die Beziehung zwischen M , S° und $[\eta]$ definiert. Er ist von der Geometrie des Kettenmoleküls abhängig. Bei synthetischen Polymeren wurde gefunden, daß β als universelle Konstante für einen weiten Molekulargewichtsbereich gelten kann. Sie ist auch für DNA gültig, und ist unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel. Der Wert $M_{S\eta}$ entspricht etwa dem Gewichtsmittel des Molekulargewichtes der DNA.

3.1.2. Sedimentationsverteilung

Um Aufschlüsse darüber zu bekommen, ob unsere Isolierungsmethode schonend genug war und keine mechanischen Degradierungen vorlagen, wurde der mit dem Densitometer erhaltene Gradient in Anlehnung an früher beschriebene Verfahren (Hagen 1967, Schumaker und Schachman 1957, Shooter und Butler 1956, Hagen und Wellstein 1965) in eine Sedimentationsverteilung umgewandelt. Erst hierdurch war es möglich zu beurteilen, ob alle Moleküle gleich schnell sedimentieren und damit molekular einheitlich waren. Auch im Hinblick auf die Berechnung von Brüchen und Vernetzungen bei bestrahlten Proben war es notwendig, die erhaltenen Gradienten zuerst in eine Sedimentationsverteilung und danach in eine Molekulargewichtsverteilung umzuwandeln. Dadurch erhält man neben dem Gewichtsmittel M_w der DNA auch das für diese Berechnungen wichtige Zahlenmittel M_n .

Im Schwerfeld der Zentrifuge wandern kleinere gebrochene Moleküle langsamer und größere vernetzte Moleküle schneller als ungebrochene DNA-Moleküle. Vergleicht man die Gradienten unbestrahlter und bestrahlter DNA-Proben, so ergibt sich, daß der Gradient bestrahlter Proben einen S-förmigen Verlauf zeigt, während der der Kontrollprobe nur eine senkrechte Linie darstellt. Die Verhältnisse werden in der Abbildung 4 verdeutlicht. Sie zeigt den Gradienten einer unbestrahlten Kontrollprobe (a) und den einer mit 1 krad bestrahlten Probe (b). Schneller oder langsamer sedimentierende Moleküle werden durch die mit einem Pfeil gekennzeichneten Anteile des Gradienten repräsentiert. Der Vergleich von Abbildung 4 (a) und 4 (b) weist auf die Notwendigkeit hin, die Gradienten genauer zu analysieren, d.h. nicht nur einen Mittelwert des Molekulargewichtes aus dem Mittelpunkt des Gradienten zu bestimmen, sondern auch die Größenverteilung der Moleküle einer DNA-Probe zu ermitteln.

Jeder Punkt des Gradienten x_i/y_i entspricht einer bestimmten Konzentration y_i von Molekülen, die nach einer gewissen Sedimentationszeit einen bestimmten Abstand x_i von der Referenzlinie hat. Zur Aufstellung der Sedimentationsverteilung wurden nun die zu jedem x_i gehörigen y_i -Werte in Millimeterschritten ausgemessen (vgl. Abb. 4). Die x_i -Werte wurden mit den Gleichungen (2.6), (2.7) und (2.8) in die $S_{app,i}$ -Werte umgerechnet.

Nach Einführung einer die Sektorform der Zelle berücksichtigenden Verdünnungskorrektur $y'_i = y_i (r_i/r_m)^2$ (r_m ist der wahre Abstand des Meniskus vom Rotationszentrum) wurde die Konzentration y_i auf die Gesamtkonzentration y'_{max} normiert:

$$c_i = y'_i / y'_{max} \quad (3.2)$$

Damit ergab sich die Möglichkeit, eine integrale Verteilung der Sedimentation $S_{app,i}$ gegen c_i darzustellen. In der Abbildung 5 sind die Sedimentationsverteilungen für drei verschiedene Konzentrationen zwischen 5 und 20 $\mu\text{g/ml}$ aufgetragen.

Um eine Verteilung der S_i^0 -Werte zu erhalten, mußten diese Kurven auf die DNA-Konzentration Null extrapoliert werden. Für die Extrapolation sind zwei verschiedene Verfahren möglich. Einmal lassen sich für verschiedene Massenanteile c_i die reziproken Sedimentationskonstanten der einzelnen Kurven auf die Konzentration Null extrapolieren, ebenso wie wir es in Abbildung 3 für $S_{app, 0,5}$ gemacht haben. Diese Art der Extrapolation wurde von Cantow (1959) beschrieben. Wir benötigen dafür die $S_{app,i}$ -Verteilungen mehrerer Konzentrationen einer Probe. Die Extrapolation eines einzelnen $S_{app,i}$ -wertes auf S_i^0 kann aber auch mit der Gleichung

$$S_i^0 = S_{app,i} [1 + K_s \cdot [\eta]_i \cdot c_A \cdot c_i] \quad (3.4)$$

vorgenommen werden. K_s ist die von Eigner und Doty (1965) definierte Konstante für die Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentation. Sie wurde in unseren Versuchen aus den $S_{app, 0,5}$ - und $[\eta]$ -Werten berechnet. In Übereinstimmung mit anderen Autoren (Aten und Cohen 1965) fanden wir K_s -Werte zwischen 0,7 und 1,0. Die zu jedem $S_{app,i}$ gehörenden Werte der Grenzviskosität $[\eta]_i$ entnahmen wir dabei einer von Eigner und Doty (1965) angegebenen Beziehung zwischen S^0 und $[\eta]$

$$[\eta] = a (S^0)^b \quad (3.5)$$

Die Größen a und b variieren etwas mit der Größe und Gestalt der Moleküle und mit S^0 und werden bei der Berechnung aus der von Eigner und Doty (1965) angegebenen Kurve für den jeweiligen Bereich entnommen. Die Beziehung gilt bei nativer DNA innerhalb eines relativ weiten Bereiches der Ionenkonzentration, und zwar von 0,1 bis 1,0 m.

Die von uns benutzte Ionenkonzentration war in allen Fällen 0,165 m. Unsere eigenen Messungen an T4 und T1-DNA stimmten mit dieser Beziehung gut überein. Auf sie wird später in einem anderen Zusammenhang noch eingegangen (vgl. Abb. 14).

Bei der Angabe der Konzentration c_A mußte noch eine Korrektur angebracht werden: Da während der fortschreitenden Sedimentation eine stetige Verdünnung der DNA-Lösung von c_A auf $c_A \cdot c_i$ stattfindet, wurde das Mittel aus beiden Werten $c_A (0,5 + c_i/2)$ in die Gleichung (3.4) eingesetzt:

$$S_i^0 = S_{app,i} [1 + K_s [\eta]_i \cdot c_A (0,5 + c_i/2)] \quad (3.6)$$

Gleichung (3.5) und (3.6) bilden ein System von nichtlinearen Gleichungen für S_i^0 , wobei $S_{app,i}$ und c_i bekannte Größen sind. Das Gleichungssystem wurde numerisch durch Iteration gelöst.

In der Abbildung 5 sind als Beispiel die aus den einzelnen $S_{app,i}$ -Werten (offene Symbole) berechneten S_i^0 -Werte (geschlossene Symbole) eingezeichnet, und zwar für eine mit 4 krad bestrahlte DNA. Sie stimmen mit der nach der ersten Methode erhaltenen S^0 -Verteilung gut überein (halbgeschlossene Symbole). Deshalb verwendeten wir für weitere Versuche nur noch die rechnerische Methode nach Gleichung (3.5) und (3.6).

3.1.3. Molekulargewichtsverteilung

Die erhaltenen Sedimentationsverteilungen mußten nun in Molekulargewichtsverteilungen umgewandelt werden. Dazu benötigten wir eine Beziehung, die die S^0 -Werte mit den Molekulargewichten verknüpft. Eigner und Doty (1965) haben aus einer Vielzahl von Veröffentlichungen, die bis 1964 erschienen waren, $S_{20,w,0,5}^0$ - und $[\eta]$ -Werte einzelner DNA-Proben zusammengetragen und mit der Gleichung (3.2) die Molekulargewichte $M_{s\eta}$ berechnet. Die $S_{20,w,0,5}^0$ -Werte trugen sie dann in Abhängigkeit zu den zugehörigen $M_{s\eta}$ -

Werten auf. Es ergibt sich eine ansteigende Kurve, die wir in Abbildung 6 aufgetragen haben. Man sieht, daß man die Kurve in zwei nahezu lineare Bereiche aufteilen kann, und zwar für den Molekulargewichtsbereich von $0,3 \cdot 10^6$ bis $4 \cdot 10^6$ und für den Molekulargewichtsbereich oberhalb 4 Millionen. Für diesen Bereich berechneten Eigner und Doty die Beziehung:

$$S_{20,w}^0 = 0,034 \cdot M^{0,405} \quad (3.7)$$

Diese Gleichung erlaubt es, die in den Sedimentationsverteilungen gefundenen Werte in die zugehörigen Molekulargewichte M_i umzuwandeln und somit Molekulargewichtsverteilungen zu berechnen. In der Abbildung 6 sind ferner die von uns gefundenen Werte an unbestrahlter T4- und T1-DNA und an bestrahlter T1-DNA eingezeichnet. Sie liegen recht gut auf der ausgezogenen Kurve und stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit denen anderer Autoren überein. Die zusammengehörenden $S_{20,w}^0$, $0,5^-$ und $M_{s\eta}$ -Werte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die von Eigner und Doty angegebenen Konstanten $A_s = 0,034$ und $B_s = 0,405$ wurden von uns durch die vergleichenden Viskositätsmessungen nachgeprüft. Dabei ergab sich, daß die Neigung des geradlinigen Kurvenabschnittes ebenfalls zu $B_s = 0,405$ gefunden wurde, A_s jedoch von Präparation zu Präparation geringfügig variierte, und zwar zwischen $0,031$ und $0,034$. Deshalb wurde für jede untersuchte Probe A_s aus $M_{s\eta}$ und $S_{0,5}^0$ berechnet und in die Gleichung (3.7) eingesetzt. Die A_s -Werte sind bei unseren Ergebnissen mit aufgeführt (vgl. Tab. 1).

Die Berechnung der gesamten Werte wurde mit einem Fortran-IV-Programm in einer Rechenmaschine IBM 7074 durchgeführt. Die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung einer bestimmten DNA-Probe erfolgte wie bei der Sedimentationsverteilung durch Auswertung von zwei bis drei Sedimentationen von Lösungen verschiedener Konzentration, wobei von jedem Sedimentationslauf zwei Aufnahmen herangezogen wurden.

In Abbildung 7 sind die Molekulargewichtsverteilungen für unbestrahlte (Kurve (A)), mit 1 krad in vitro bestrahlte (Kurve (B)) und mit 4 krad in vitro bestrahlte (Kurve (C)) T1-DNA aufgetragen. Die einzelnen Meßpunkte der einzelnen Versuche liegen recht gut zusammen, so daß sie graphisch durch eine Kurve gemittelt werden konnten. Ferner läßt sich aus den einzelnen Molekulargewichtsverteilungen (M_i , c_i) das Gewichts- und das Zahlenmittel des Molekulargewichtes bestimmen, indem die Molekulargewichtsverteilung in Klassen von $(i-1)$ bis i eingeteilt wird. Der Massenanteil jeder Klasse ist dann $m_i = c_i - c_{i-1}$ und das zugehörige mittlere Molekulargewicht ist:

$$MG_i = \frac{M_i - M_{i-1}}{2} \quad (3.8)$$

Das Gewichtsmittel des Molekulargewichtes ist dann:

$$M_w = \sum_{i=1}^n m_i \cdot MG_i \quad (3.9)$$

und das Zahlenmittel:

$$M_n = \left(\sum_{i=1}^n m_i / MG_i \right)^{-1} \quad (3.10)$$

Die aus den verschiedenen Sedimentationen einer DNA-Probe erhaltenen Werte für M_w und M_n können gemittelt oder einzeln für die weitere Analyse verwendet werden (vgl. Tab. 1).

3.2. Molekulargewicht und Molekulargewichtsverteilung von Phagen-DNA nach Bestrahlung in vitro

3.2.1. Unbestrahlte Phagen-DNA

Wie aus der Abbildung 3 ersichtlich, erhielten wir bei der Extrapolation von $1/S_{app, 0,5}$ gegen die Konzentration $c_A=0$ einen $S_{20,w, 0,5}^0$ -Wert von 35,0 und eine Grenzviskosität $[\eta] = 134$ dl/g. Als mittleres Molekulargewicht, berechnet

nach der Gleichung (3.2), ergab sich daraus $M_{S\eta} = 29,9 \cdot 10^6$. Für eine andere DNA-Präparation erhielten wir $M_{S\eta} = 30,5 \cdot 10^6$. Beide Werte stimmen mit dem von Bresler u.a. (1967) angegebenen Wert von $31 \cdot 10^6$ recht gut überein.

Um zu prüfen, ob unser Isolierungsverfahren der DNA schonend genug war, isolierten wir DNA aus T4-Phagen und erhielten hier mit $S_{20,w, 0,5}^0 = 64,5$ und $[\eta] = 320$ dl/g in recht guter Übereinstimmung mit dem von Aten und Cohen (1965) gefundenen Wert ein Molekulargewicht von $M_{S\eta} = 115 \cdot 10^6$. Jedoch ist mit der Angabe des Molekulargewichtes allein noch nicht bewiesen, daß die isolierte DNA keine mechanisch gebrochenen Anteile enthält, da zur Berechnung von $M_{S\eta}$ nur der Mittelpunkt des Gradienten ($y_i = 0,5$) ausgewertet wird. Die Abbildung 7 zeigt jedoch, daß die Molekulargewichtsverteilung der unbestrahlten T1-DNA über den gesamten Massenbereich einen einheitlichen senkrechten Gradienten darstellt, d.h. alle Moleküle haben das gleiche Molekulargewicht.

Bei einigen Präparationen erhielten wir Beimengungen von mechanisch gebrochenen Molekülen, die sich in der Molekulargewichtsverteilung im unteren Massenbereich als schräger Anteil des Kurvenzuges bemerkbar machten. Dieser Anteil war jedoch in keinem Falle höher als 5 % der Gesamtmasse.

3.2.2. Veränderungen der DNA-Struktur nach Bestrahlung in Lösung

In die Abbildung 3 wurden außer den $1/S_{app, 0,5}$ -Werten für unbestrahlte DNA (geschlossene Symbole) auch die Werte für DNA, die mit 1 krad bestrahlt wurden (offene Symbole) eingetragen. Danach haben beide DNA-Proben etwa den gleichen $S_{0,5}^0$ -Wert. Auch die ermittelten Molekulargewichte $M_{S\eta}$ mit 30,5 und 30,22 unterscheiden sich kaum. Daraus könnte geschlossen werden, daß die bestrahlten DNA-Moleküle nach Bestrahlung mit 1 krad unverändert bleiben,

also keine Brüche oder andere Ereignisse stattfinden. Ein Vergleich der Molekulargewichtsverteilungen in Abbildung 7 (Kurve A und B) zeigt jedoch, daß nach Bestrahlung mit 1 krad nur noch etwa 30 % der Moleküle das ursprüngliche Molekulargewicht aufweisen. Etwa 36 % der Moleküle haben kleinere Molekulargewichte, sind also degradiert und etwa 30 % der DNA haben ein höheres Molekulargewicht als vor der Bestrahlung. Hier zeigt sich wieder, daß vor allem bei kleinen Bestrahlungsdosen erst mit Hilfe der Molekulargewichtsverteilung genauere Aussagen über strahlenbedingte Ereignisse in der DNA gemacht werden können. In der Abbildung 8 haben wir die Molekulargewichtsverteilungen der mit 1 krad, 2 krad, 4 krad und 7,7 krad bestrahlten DNA zusammen mit der der unbestrahlten Kontroll-DNA aufgetragen. Schon nach Bestrahlung mit 2 krad läßt sich kein senkrechter Anteil der Verteilungskurve mehr beobachten. Der Anteil der gebrochenen Moleküle erhöht sich mit steigender Dosis, während der Anteil der Moleküle mit erhöhtem Molekulargewicht nahezu gleich bleibt. Erst bei 7,7 krad sind fast alle Moleküle degradiert und der Anteil der Moleküle mit höherem Molekulargewicht als das der Kontrolle ist sehr gering. Die einzelnen Daten dieser Versuchsserie finden sich in Tabelle 1.

3.2.3. Bestimmung der Zahl der Brüche und der Vernetzungen

Aus den in Abbildung 8 gezeigten Molekulargewichtsverteilungen hat sich ergeben, daß nach Bestrahlung kleinere sowie auch größere DNA-Moleküle entstehen. Das macht die Entstehung von Brüchen in der DNA-Kette sowie die Bildung von Vernetzungen wahrscheinlich. Der Mechanismus ihrer Entstehung wurde in der Einleitung behandelt. Um eine formale Analyse der Brüche und der Vernetzungen durchzuführen, ist es zweckmäßig, ihre Anzahl auf die Zahl der Monomere im Polymer zu beziehen. Es ergibt sich dabei die Bruch- oder Vernetzungswahrscheinlichkeit pro Monomer.

Wie von Hagen (1967) gezeigt wurde, entstehen Brüche in der Einzelkette der DNA linear mit der Dosis. Es ist

$$\alpha = p D \quad (3.12)$$

wobei α die jeweils nach einer Bestrahlung eingetretene Bruchrate pro Monomer (= Nukleotid) ist, und p die Bruchrate pro Monomer und pro rad. Brüche der Doppelhelix der DNA entstehen nach Bestrahlung in wässriger Lösung quadratisch zur Dosis. Formal können wir für die Bruchwahrscheinlichkeit des Doppelstranges (A) angeben:

$$A = (pD + \beta)^2 n \quad (3.13)$$

wobei β die Bruchwahrscheinlichkeit des Einzelstranges bedeutet, die bereits vor der Bestrahlung bestand. Wie von Hagen (1967) gezeigt wurde, wird an Kalbsthymus-DNA die gefundene Bruchwahrscheinlichkeit α und A durch $n = 7$ am besten beschrieben. Es wurde daraus geschlossen, daß bei der Bestrahlung wässriger DNA-Lösungen ein Bruch der Doppelhelix nur dann entsteht, wenn zwei Einzelbrüche (pD oder β) genau gegenüber liegen oder sich innerhalb von 6 weiteren benachbarten Nukleotidbindungen ereignen. Da bei unseren Versuchen die Zahl der Einzelbrüche nicht bestimmt wurde, können wir diese Ergebnisse mit unserem Untersuchungsmaterial nicht nachprüfen. Gleichung (3.13) eignet sich jedoch für eine formale Beschreibung der Bruchwahrscheinlichkeit des Doppelstranges, die hier sinngemäß auf ein Nukleotidpaar bezogen wird.

Nach Erfahrungen aus der Strahlenchemie synthetischer Polymere (Henglein und Schnabel, 1966) können wir annehmen, daß Vernetzungen linear mit der Dosis entstehen.

$$Q = q D \quad (3.14)$$

wobei Q die Vernetzungswahrscheinlichkeit pro Nukleotid nach einer bestimmten Dosis bedeutet und q die Vernetzungswahrscheinlichkeit eines Monomers pro rad.

Für die doppelsträngige Bakteriophagen-DNA läßt sich A und Q aus M_n und M_w der bestrahlten Probe ermitteln. Das Molekulargewicht der unbestrahlten Probe bezeichnen wir mit M_o ; wobei $M_o = M_n = M_w$ ist, da es sich bei unseren DNA-Proben um ein molekular einheitliches Polymer handelt. Der Polymerisationsgrad P der DNA-Proben ergibt sich aus $P = M/m$, wobei m hier das mittlere Molekulargewicht eines Nukleotidpaares ist. Die Zahl der Brüche B pro DNA-Molekül nach einer bestimmten Dosis ergibt sich aus der mittleren Kettenlänge P_n :

$$B = P_o/P_n - 1$$

und die Bruchwahrscheinlichkeit pro Monomer

$$A_{app} = \frac{B}{P_o} = \frac{1}{P_n} - \frac{1}{P_o} = \left(\frac{1}{M_n} - \frac{1}{M_o} \right) m$$

Die gemessene Bruchwahrscheinlichkeit A_{app} entspricht der wahren Bruchwahrscheinlichkeit A, wenn gleichzeitig keine Vernetzungen auftreten. Ereignen sich neben den Brüchen auch Vernetzungen, so ist $\frac{1}{P_n}$ um $\frac{Q}{2}$ kleiner (Charlesby, 1960). Es ist dann

$$A - \frac{Q}{2} = \left(\frac{1}{M_n} - \frac{1}{M_o} \right) m \quad (3.15)$$

Das Gewichtsmittel M_w wird durch Vernetzungen stärker beeinflußt als durch Brüche. Es gilt hier nach Charlesby (1960)

$$\frac{A}{2} - Q = \left(\frac{1}{M_w} - \frac{1}{M_o} \right) m \quad (3.16)$$

Aus Gleichung (3.15) und (3.16) können wir durch Substitution A und Q berechnen. Es ergibt sich dann

$$A = \left(\frac{2}{M_n} - \frac{1}{M_o} - \frac{1}{M_w} \right) \frac{m}{1,5} \quad (3.17)$$

$$Q = \left(\frac{1}{M_n} + \frac{1}{M_o} - \frac{2}{M_w} \right) \frac{m}{1,5} \quad (3.18)$$

Die Beziehung von A und Q zur Dosis ergibt sich aus der Gleichung (3.13) und (3.14). Demnach entstehen Doppelbrüche einmal quadratisch mit der Dosis ($n p^2 D^2$) sowie linear mit der Dosis ($2 n p \beta D$). $\beta^2 n$ ist der Anteil der Doppelbrüche, der bereits vor der Bestrahlung vorhanden war. Oben wurde erwähnt, daß dieser Anteil bei der Bakteriophagen-DNA nicht sicher meßbar war. Er soll deshalb bei den weiteren Überlegungen nicht berücksichtigt werden. Setzen wir $np^2 = c$ und $2 np\beta = b$, so erhalten wir

$$A = b D + c D^2 \quad (3.19)$$

Nach Gleichung (3.17) und (3.18) kann nun für jede gemessene DNA-Probe A und Q berechnet werden und gegen die Dosis aufgetragen werden. Weiter erwies es sich als günstig, A und Q aus M_n und M_w jeder einzelnen Molekulargewichtsverteilung zu berechnen. Da bei jeder einzelnen DNA-Probe 4 - 8 Molekulargewichtsverteilungen bestimmt wurden, haben wir dann zur Charakterisierung jeder DNA-Probe den Mittelwert der 4 - 8 Werte von A und Q sowie deren Varianz zur Verfügung. Die entsprechenden Werte für unsere Bestrahlungsserien in vitro finden sich in Tabelle 1 und 2, sowie in Abbildung 9 und 10.

Abbildung 9 zeigt die Beziehung von A zur Dosis bei 2 Versuchsserien mit zwei verschiedenen DNA-Präparationen. Die 1. Serie zeigt eine deutlich geringere Empfindlichkeit als die 2. Serie. Wir möchten annehmen, daß dies durch Verunreinigungen an niedermolekularen Bestandteilen und an Proteinen bedingt ist. Eine intensive Reinigung der DNA-Lösung verbot sich jedoch, da sie meist mit erheblichen Scherkräften verbunden ist. Wie aus (3.19) erwartet werden konnte, enthält die Dosiseffektkurve von A eine lineare und quadratische Komponente. Mittels Regressionsanalyse wurde b und c für die geringste quadratische Abweichung ermittelt. Es ergab sich dann:

1. Serie	$b = 2,57 \cdot 10^{-9}$,	$c = 0,80 \cdot 10^{-12}$
2. "	$b = 4,22 \cdot 10^{-9}$,	$c = 1,90 \cdot 10^{-12}$

Wie Abbildung 10 zeigt, steigen die Werte für Q zunächst linear mit der Dosis an, erreichen dann aber eine Sättigung, d.h. es entstehen keine neuen Vernetzungen mehr. Allerdings fanden sich bei der 2. Versuchsserie zwei deutliche Abweichungen, deren Bedeutung erst in umfangreichen Versuchsserien geklärt werden kann. Die Anfangssteigerung von Q ergibt ein $q = 1,4 \cdot 10^{-9}$, d.h. die Vernetzungsrates beträgt etwa die Hälfte des linearen Anteils der Doppelbrüche. Da mit höheren Dosen der quadratische Anteil der Doppelbrüche überwiegt und zudem die Vernetzungen nicht mehr zunehmen, spielen Vernetzungen bei der Bestrahlung verdünnter DNA-Lösungen nur nach kleinen Dosen eine Rolle. Die Ursachen dieser Erscheinung sollen später erörtert werden.

3.2.4. Die Wirkung von Sauerstoff auf DNA-Lösungen während der Bestrahlung

In den vorangegangenen Kapiteln haben wir dargelegt, daß nach Bestrahlung wässriger DNA-Lösungen unter Stickstoffatmosphäre sowohl Brüche in der DNA-Doppelhelix, als auch Vernetzungen zwischen den Molekülen eintreten. Wir konnten die Zahl der Brüche und der Vernetzungsereignisse errechnen. Nun interessierte uns die Frage, ob sich nach Bestrahlung unter Sauerstoffatmosphäre andere Molekulargewichtsverteilungen ergeben und sich damit das Verhältnis zwischen Brüchen und Vernetzungen verschiebt. Hagen und Wellstein (1965) konnten nach Bestrahlung trockener DNA im Vakuum und unter Sauerstoff feststellen, daß die Zahl der Doppelbrüche sich gegenüber der Bestrahlung im Vakuum nur geringfügig ändert. Vernetzungsereignisse gehen jedoch in Anwesenheit von Sauerstoff etwa um die Hälfte zurück. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Lett und Alexander (1961). Nach diesen Untersuchungen nimmt unter Sauerstoff die Zahl der Vernetzungen ab, während die Zahl der Doppelbrüche sich nur wenig erhöht. Es lag nun nahe, zu untersuchen, ob sich nach Bestrahlung wässriger DNA-Lösungen ähnliche Effekte einstellen.

Lösungen mit 200 $\mu\text{g/ml}$ DNA wurden 10 min mit Stickstoff bzw. Sauerstoff gesättigt und mit 1 kR, 2 kR und 4 kR bestrahlt. Allerdings verbot sich eine intensive Durchströmung der Lösung mit O_2 während der Bestrahlung, da durch die dabei auftretenden Scherkräfte eine Degradierung möglich war. Anschließend wurde nach entsprechender Verdünnung sedimentiert und die Grenzviskosität gemessen. Mit den erhaltenen Daten für $S_{20,w}^0$, 0,5 und $[\eta]$ wurden, wie schon beschrieben, die Sedimentations- und Molekulargewichtsverteilungen berechnet.

In der Tabelle 2 sind die erhaltenen Werte für $S_{20,w}^0$, 0,5, $[\eta]$, M_w , M_n , A und Q aufgeführt. Vergleicht man die Daten miteinander, so ergibt sich im wesentlichen kein Unterschied zwischen beiden Gasatmosphären. Eine Änderung des Verhältnisses von Brüchen und Vernetzungsreaktionen unter Sauerstoffatmosphäre konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Auch die Form der Molekulargewichtsverteilung unterscheidet sich bei den verschiedenen Dosen für beide Gasbedingungen nur unwesentlich; entsprechend sind A und Q nicht signifikant voneinander verschieden.

3.3. Veränderungen der DNA bestrahlter Phagen

3.3.1. Phageninaktivierung

In dem vorangegangenen Teil der Arbeit haben wir gezeigt, daß die Methoden der Ultrazentrifugation und der Viskositätsmessungen geeignet waren, Doppelbrüche und Vernetzungen nach Bestrahlung wässriger DNA-Lösungen zu erfassen. In dem nun folgenden Teil wollen wir uns mit dem direkten Strahlenschaden der DNA bestrahlter Phagen beschäftigen und versuchen, die physikalisch-chemischen Veränderungen der DNA mit dem biologischen Effekt der Strahlung in Beziehung zu setzen.

Unter biologischem Effekt soll im Folgenden der Verlust der Koloniebildungsfähigkeit verstanden werden, wobei die möglicherweise intakt bleibenden Funktionen der Phagen,

wie Adsorptionsfähigkeit an das Wirtsbakterium und die Fähigkeit, den Wirt abzutöten nicht in die Betrachtungen einbezogen werden sollen.

Das zum Studium direkter Strahlenwirkungen üblicherweise verwendete Medium ist eine 5prozentige Nährbouillon (5 x NB). In dieser Lösung werden nahezu alle diffusiblen Wasserradikale durch das Protein des Lösungsmittels abgefangen, so daß die auftretenden Schäden nur durch die direkt im DNA-Molekül absorbierte Energie verursacht werden. Wir stellten nun in einigen orientierenden Vorversuchen fest, daß die Abtrennung des Hüllproteins von der DNA aus Phagen, die wir in diesem Medium bestrahlt hatten, erst nach vier- bis fünfmaliger Phenolbehandlung gelang. Hierdurch war eine Freisetzung der DNA ohne mechanische Degradierungen, die die strahlenbedingten Veränderungen der DNA verfälscht hätten, nicht mehr gewährleistet. Wir versuchten nun durch Abzentrifugieren und Resuspendieren der Phagen in Puffer, das Fremdprotein des Bestrahlungsmediums abzutrennen. Jedoch befanden sich im Phagensediment noch erhebliche Mengen des Proteins (erkennlich an der braunen Farbe des Niederschlags), so daß die Isolierung der DNA nicht wesentlich erleichtert wurde.

Wir suchten deshalb nach einem Bestrahlungsmedium, das sowohl den gleichen Schutz wie 5 x NB gegen den Einfluß der diffusiblen Agentien des Wassers bot, als auch eine schonendere Isolierung der DNA aus den bestrahlten Phagen gestattete. Watson (1950, 1952) zeigte, daß die gradzahligen Phagen, die in 10^{-3} m Histidinlösung bestrahlt wurden, die gleiche Dosiseffektkurve aufweisen wie nach Bestrahlung in 5 x NB. Freifelder (1965) konnte das gleiche für T7-Phagen zeigen, die den T1-Phagen sehr ähnlich sind. Wir untersuchten nun, ob die Ergebnisse der beiden Autoren auch auf die von uns verwendeten T1-Phagen zu übertragen waren. Es zeigte sich, daß T1-Phagen

erst durch eine 0,1 m Histidinlösung hinreichend geschützt werden. Da sich auch die DNA aus den in diesem Medium bestrahlten Phagen ohne die erwähnten Schwierigkeiten isolieren ließ, suspendierten wir für alle weiteren Versuche die Phagen in 0,1 m Histidinlösung.

In Abbildung 11 haben wir die Dosiseffektcurven für die Bestrahlung in 5 x NB (offene Symbole) und für Bestrahlung in 0,1 m Histidinlösung (geschlossene Symbole) aufgetragen. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchsreihen. Es ergibt sich eine gute Übereinstimmung der Werte.

Die dargestellte Dosiseffektcurve folgt einer Eintreffer-Exponentialgleichung

$$\frac{N}{N_0} = e^{-kD} \quad (3.18)$$

N_0 gibt die Zahl der bestrahlten Phagenpartikel an. N ist die Zahl der Phagen, die nach der Bestrahlung noch zur Koloniebildung fähig ist. Im halblogarithmischen Maßstab ergibt sich eine Gerade mit der Steigung k , wenn man auf der Abszisse die Strahlendosis D (krad) und auf der Ordinate den Bruchteil noch aktiver Phagen aufträgt. Bei exponentiellen Dosiseffektcurven gibt man üblicherweise die Dosis an, bei der im Mittel alle bestrahlten Einheiten einmal getroffen worden sind. Dies ist die Dosis, bei der $kD = 1$ ist, d.h.

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

Man bezeichnet diese Dosis als D_{37} . Die D_{37} für beide Bestrahlungsmedien beträgt, wie aus Abbildung 13 ersichtlich ist, 95 krad. Derselbe Wert wurde für Bestrahlung in 5 x NB auch von anderen Autoren gefunden (Hotz und Zimmer, 1963).

Freifelder (1965) konnte zeigen, daß ein gewisser Prozentsatz der Phagen während der Bestrahlung aufplatzt und die DNA dieser Phagen freigesetzt wird. Dieser Anteil der DNA

wird, da er außerhalb des Hüllproteins bestrahlt wird, relativ mehr geschädigt und könnte die Ergebnisse einer Bestrahlung in vivo verfälschen. Diese Fehlerquelle kann man ausschließen, wenn man die Phagen nach Bestrahlung abzentrifugiert und so diesen Anteil der DNA abtrennt. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß die Phagen zwar platzen, ihre DNA aber nur unvollständig freisetzen, so daß man sie durch Abzentrifugieren nicht entfernen kann. Wir behandelten die Phagensuspension deshalb nach Bestrahlung mit DNase (10 µg/ml), wodurch alle DNA-Moleküle, die sich nicht mehr vollständig im Phagenkopf befanden, abgebaut werden. Nach Entfernen der DNase durch Abzentrifugieren der Phagen und anschließendem Waschen in Puffer isolierten wir dann die DNA. Es stellte sich heraus, daß mit steigenden Dosen die Ausbeute an DNA immer geringer wurde, ein Zeichen dafür, daß ein immer größer werdender Prozentsatz der Phagen während der Bestrahlung platzt. Dieser Anteil betrug jedoch niemals mehr als 10 %.

Bestrahlt wurden Phagensuspensionen vom Titer $1 \cdot 10^{12}$ /ml mit 50, 100, 150, 250, 350, 500, 750 und 1000 kR. In insgesamt 4 Versuchsreihen wurde die Wirkung der einzelnen Dosen auf die DNA der bestrahlten Phagen 2 - 4mal untersucht. Von jeder DNA-Probe aus den bestrahlten Phagen wurde eine vollständige Analyse des Molekulargewichtes sowie der Molekulargewichtsverteilung in der unter 3.1. beschriebenen Weise durchgeführt.

3.3.2. Bestimmung der Bruchrate aus den Gradienten der Sedimentation

Wir deuteten in der Einleitung schon darauf hin, daß Freifelder (1965) den Anteil gebrochener DNA-Moleküle in vivo bestrahlter T7-DNA mit der Überlebensrate der Phagen in Beziehung setzte und für Bestrahlung in Histidinlösung, also in dem Medium, in dem vorwiegend direkte Strahlenschäden der DNA zu erwarten sind, 0,4 Brüche pro inaktiviertem Phagen gefunden hat.

Zur Bestimmung der Bruchrate wertete Freifelder die Gradienten der Sedimentationsdiagramme aus. Wie wir in 3.1.2. schon beschrieben haben, wandern die kürzeren, gebrochenen DNA-Moleküle im Schwerfeld der Zentrifuge langsamer als die intakten Moleküle und werden im Sedimentationsdiagramm durch einen schrägen Anteil des Gradienten repräsentiert. Freifelder bestimmte den schrägen Anteil in Prozent der Gesamthöhe des Gradienten. Dazu verwendete er pro Dosis den Gradienten einer nach zwanzigminütiger Zentrifugation bei 33 450 Upm aufgenommenen UV-Aufnahme.

In Abbildung 12a haben wir als Beispiel den Gradienten einer mit 50 krad in vivo bestrahlten T1-DNA aufgetragen, den wir nach 96 Minuten Zentrifugation bei 15 220 Upm erhielten. Der die gebrochenen Moleküle repräsentierende Abschnitt des Gradienten ist mit einem Pfeil gekennzeichnet, der nahezu senkrecht verlaufende Anteil gibt die nicht gebrochenen Moleküle wieder. Bei höheren Dosen, ab 150 krad, erhielten wir S-förmig verlaufende Gradienten (Abbildung 12b), die neben dem Anteil gebrochener Moleküle noch auf einen schneller sedimentierenden Teil von Molekülen hinweisen, ähnlich wie in Abbildung 4b für die Bestrahlung wässriger DNA-Lösungen. Dieser Anteil wurde erst mit fortschreitender Sedimentationsdauer ab der vierten UV-Aufnahme, also nach 48 minütiger Zentrifugation deutlich. Wir bestimmten nun den gradlinig verlaufenden Gradientenabschnitt im Verhältnis zur Gesamthöhe des Gradienten und berechneten daraus die Prozentzahl der unebrochenen und nicht veränderten Moleküle. Ausgewertet wurden die Ergebnisse von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Bestrahlungsversuchen. Jeweils die Gradienten der fünften und siebten UV-Aufnahme wurden für vier bis sechs Konzentrationen ausgemessen. Der Mittelwert der erhaltenen Prozentzahlen je Versuch wurde dann in Abhängigkeit von der Prozentzahl der noch überlebenden Phagen, die aus Abbildung 11 erhalten wurde, aufgetragen (Abbildung 13, geschlossene Symbole). Die offenen

Symbole geben den Anteil der schneller als die noch ungeschädigten Moleküle sedimentierenden DNA-Fraktion an.

Über 350 krad nahmen die in Abbildung 12b durch Pfeile gekennzeichneten schrägen Anteile der gebrochenen bzw. schneller sedimentierenden Moleküle einen immer höher werdenden Prozentsatz an der Gesamthöhe des Gradienten ein, so daß eine eindeutige Bestimmung des geradlinigen Anteils nicht mehr gewährleistet war.

Wie aus Abbildung 13 ersichtlich ist, verläuft die eingetragene Kurve zunächst nahezu gradlinig (bis etwa 50 krad) mit der Neigung 0,33, d.h. bei niedrigen Strahldosen erhalten wir 0,33 Brüche pro inaktiviertem Phagen.

Bei höheren Dosen treten neben Doppelbrüchen offenbar noch andere strahlenbedingte Ereignisse ein, die zum Inaktivierungsprozess der Phagen beisteuern. Dies wird aus dem Auftreten eines schneller sedimentierenden Anteils des Gradienten deutlich. Bei der Beschreibung der Untersuchungen an in wässriger Lösung bestrahlter DNA deuteten wir das Auftreten des die schneller sedimentierenden Moleküle repräsentierenden Anteils des Gradienten als intermolekulare Vernetzungen. Bei der Bestrahlung der DNA im Phagen kann es nicht zu intermolekularen Vernetzungen von Radikalstellen verschiedener DNA-Moleküle kommen. Jedoch könnten zwei Radikalstellen des im Phagen sehr dicht gepackten DNA-Moleküls miteinander reagieren und dadurch intramolekulare Vernetzungen stattfinden. Ein so vernetztes Molekül kann sich nach der Isolierung aus dem Phagen nicht vollständig entfalten. Der dadurch bedingte kleinere Durchmesser des Moleküls bewirkt eine schnellere Sedimentation im Schwerfeld der Zentrifuge.

3.3.3. Sedimentationsverteilungen

Um weitere Aufschlüsse über die strahlenbedingten Veränderungen von DNA bestrahlter T1-Phagen zu erhalten, versuchten wir, ähnlich wie unter 3.1.2. beschrieben, die erhaltenen Gradienten der UV-Aufnahmen in Sedimentationsverteilungen umzuwandeln. Es interessierte uns die Frage, ob durch die Sedimentationsverteilungen und ihre anschließende Umwandlung in die Molekulargewichtsverteilung mit Hilfe der Berechnung der Bruchwahrscheinlichkeit A und der Vernetzungsrate Q die in Abbildung 13 aufgetragenen Ergebnisse bestätigt werden konnten und ob für die höheren Dosen von 350 krad bis 1000 krad über eine solche Betrachtung weitere Aussagen über den Strahlenschaden bei sehr niedrigen Überlebensraten zu erhalten waren. Aus der Veröffentlichung von Freifelder (1965) geht hervor, daß der Autor nur die Bruchraten bis zu siebenzig Prozent der Phageninaktivierung aus den Gradienten der UV-Aufnahmen bestimmt hat und daß er die Bruchraten bis zu hundert Prozent der Phageninaktivierung geradlinig extrapoliert, die Werte sind in diesem Bereich also nicht gesichert. Auf der anderen Seite sieht man aus unserer Darstellungsweise in Abbildung 13, daß gerade im Bereich von siebenzig bis hundert Prozent der Phageninaktivierung neben den Brüchen wahrscheinlich noch Vernetzungen als weitere Strahlenschäden hinzukommen. Zur Stützung dieses Befundes bietet sich daher eine genauere Analyse der erhaltenen Gradienten über die Sedimentations- und Molekulargewichtsverteilungen an.

Zur Aufstellung der Sedimentationsverteilungen wurden wiederum die zu jedem x_i gehörenden y_i -Werte der Gradienten in Millimeterschritten ermittelt. Die x_i -Werte wurden dann mit den Gleichungen (2.6), (2.7) und (2.8) in die $S_{app,i}$ -Werte umgerechnet. Wie unter 3.1.2. beschrieben wurde, müssen die $S_{app,i}$ -Werte mit Hilfe der Gleichung (3.6) auf S_i^0 extrapoliert werden. Die zu jedem $S_{app,i}$

gehörenden Werte der Grenzviskosität $[\eta]_i$ entnehmen wir dabei der von Eigner und Doty (1965) angegebenen Beziehung zwischen S^0 und $[\eta]$ (3.5). Wir mußten uns jedoch zuerst überzeugen, ob die von uns gemessenen $S_{20,w, 0,5}^0$ und $[\eta]$ -Werte für die DNA bestrahlter Phagen der von den Autoren angegebenen Beziehung entsprachen. Dies war wichtig, da die Größen a und b in Gleichung (3.5) von der Länge und Gestalt der Moleküle abhängig sind und sich vielleicht durch intramolekulare Vernetzungen ändern konnten.

In Abbildung 14 sind die von uns für verschiedene Strahlendosen gemessenen Werte von $S_{20,w, 0,5}^0$ und $[\eta]$ aufgetragen. Sie liegen zum überwiegenden Teil auf oder nahe an der Kurve, die wir von Eigner und Doty übernommen haben (ausgezogene Kurve). Damit war gerechtfertigt, aus dieser Beziehung (3.5) die zu jedem $S_{app,i}$ gehörenden $[\eta]_i$ -Werte zu entnehmen und mit den extrapolierten S_i^0 -Werten Sedimentationsverteilungen für die verschiedenen Strahlendosen zu berechnen.

In Abbildung 15 sind diese Verteilungen graphisch dargestellt. Jeder Kurvenzug bildet die Mittelwertskurve aus mindestens zwei unabhängig voneinander vorgenommenen Bestrahlungsversuchen. Im schraffierten Bereich liegen die senkrecht verlaufenden Sedimentationsverteilungen von fünf unbestrahlten DNA-Proben. Hieraus sieht man, daß die Methode der Darstellungen von Sedimentationsverteilungen noch mit relativ großen Fehlern behaftet ist. Man erkennt jedoch, daß mit steigenden Strahlendosen der Anteil von gebrochenen, also langsamer sedimentierenden Molekülen ansteigt und bei den hohen Dosen ab 350 krad der mit höherem S_i^0 -Wert sedimentierende Anteil deutlich hervortritt.

Einige der von uns gemessenen Werte für $S_{20,w, 0,5}^0$ und $[\eta]$ weichen stark von der durchgezogenen Kurve in Abbildung 14 ab und scheinen einem anderen funktionalen Zusammenhang zwischen $S_{20,w, 0,5}^0$ und $[\eta]$ zu folgen. Die gestrichelte

Mittelwertskurve dieser Werte verläuft parallel zu der von Eigner und Doty angegebenen Kurve, so daß für sie die Gleichung gelten kann:

$$[\eta] = a'(S^0)^b \quad (3.20)$$

In Abbildung 16 sind die Sedimentationsverteilungen dieser DNA-Präparationen aufgetragen. Sie weichen für die entsprechenden Strahlendosen in ihrem Verlauf stark von den in Abbildung 15 wiedergegebenen ab. Der Versuch einer Deutung dieser Befunde soll in der Diskussion vorgenommen werden.

3.3.4. Molekulargewichtsverteilungen, Bestimmung der Zahl der Brüche und Vernetzungen

Die Sedimentationsverteilungen von DNA bestrahlter Phagen in Abbildung 15 hatten gezeigt, daß nach Bestrahlung sowohl langsamer als auch schneller sedimentierende Moleküle im Vergleich zur Sedimentationsgeschwindigkeit der unversehrten Moleküle entstanden waren. Da die DNA im Phagenkopf bestrahlt wurde, war eine intramolekulare Vernetzung zwischen zwei DNA-Molekülen nicht möglich, wohl aber intramolekulare Vernetzungen innerhalb eines Moleküls. Dies bedeutet, daß das Molekulargewicht durch eine solche Reaktion nicht wie im Falle der Bestrahlung von wässrigen DNA-Lösungen größer werden kann als das einer unbestrahlten Kontrolle, daß also die Erhöhung der S_i^0 -Werte nicht gleichbedeutend ist mit einer Erhöhung der Molekulargewichte.

Unter 3.1.3. hatten wir beschrieben, daß mit Hilfe von Gleichung (3.7) die in den Sedimentationsverteilungen gefundenen Werte in die zugehörigen Molekulargewichte M_i umgewandelt und Molekulargewichtsverteilungen berechnet werden können. In Abbildung 17 sind die Sedimentationsverteilungen der Abbildung 15 in Molekulargewichtsverteilungen umgerechnet und aufgetragen worden. Dies war jedoch nur bei den DNA-Präparationen möglich, deren S^0 -

und $[\eta]$ -Wert auf der von Eigner und Doty angegebenen Beziehung lag. Diese Moleküle besaßen also im Mittel das gleiche hydrodynamische Verhalten wie die unbestrahlten Kontrollen. Der Anteil der Kurvenzüge mit höherem Molekulargewicht als das der unbestrahlten DNA-Probe repräsentiert hier nach dem oben gesagten Moleküle, die durch intramolekulare Vernetzungsreaktionen im Schwerfeld der Ultrazentrifuge schneller sedimentieren als ungeschädigte DNA. Solche schnell wandernden Moleküle werden, ähnlich wie in Abbildung 15, erst bei höheren Strahlendosen sichtbar. Bei den Strahlendosen bis zu 100 krad sind noch Fraktionen ungeschädigter Moleküle, die durch einen senkrechten Abschnitt der Verteilung angezeigt werden, erkennbar. Mit steigenden Dosen werden die Anteile kleiner Bruchstücke immer größer. Jedoch können auch im Molekulargewichtsbereich unterhalb von $30 \cdot 10^6$ die Bruchstücke der DNA miteinander vernetzt sein.

Aus den einzelnen Molekulargewichtsverteilungen läßt sich nun das Gewichts- und Zahlenmittel der Molekulargewichte berechnen. Mit den Gleichungen (3.17) und (3.18) erhält man die Bruchwahrscheinlichkeit A und die Vernetzungsrate Q. Die Mittelwerte von A und Q aus allen Versuchsreihen finden sich für jede Dosis in Tabelle 3, sowie in Abbildung 18 und 19. Hierbei sind insbesondere die Ergebnisse nach hohen Strahlendosen zuverlässig, da bei diesen Präparationen die meisten der Moleküle unter $30 \cdot 10^6$ liegen, d.h. sie sind in der Lösung vollständig entfaltet.

Abbildung 18 zeigt die Beziehung von A zur Strahlendosis. Folgt man formal der Gleichung (3.19), so kann die Dosis-effektkurve für A eine lineare und eine quadratische Komponente enthalten. Die Regressionsanalyse für diese Komponenten b und c ergaben:

$$b = 2,4 \cdot 10^{-11}; \quad c = 0,107 \cdot 10^{-16}$$

Wie die Abbildung 19 zeigt, scheinen die Werte für die Vernetzungsrate Q in einem weiten Dosisbereich linear anzusteigen, erreichen also nicht wie bei der Bestrahlung wässriger DNA-Lösungen einen Sättigungswert. Aus der Steigung der Q -Werte ergab sich ein $q = 0,5 \cdot 10^{-11}$, d.h. die Vernetzungsrate beträgt etwa ein Fünftel des linearen Anteils der Doppelbrüche. Bei der Bestrahlung der DNA im Phagen sind also die Vernetzungsreaktionen nicht nur bei kleinen Strahlendosen durch den schnell wandernden Anteil nicht völlig entfalteter Moleküle zu erkennen, sondern auch bei hohen Inaktivierungsraten der Phagen durch die Analyse der Molekulargewichtsverteilung der Bruchstücke.

3.4. Schmelzpunkt und Renaturierung unbestrahlter und bestrahlter DNA-Lösungen

3.4.1. Schmelzpunkt und Renaturierung unbestrahlter DNA-Lösungen verschiedener Herkunft

Die Strahlenschäden der Desoxyribonukleinsäure werden durch die Analyse der Brüche und der Vernetzungen nur zum Teil erfaßt. Neben der Schädigung der Basenstruktur interessiert auch die Stabilität der Wasserstoffbrücken. Aussagen darüber erhält man insbesondere durch die Bestimmung der optischen Dichte der DNA bei verschiedener Temperatur.

Der Übergang von der Helix- zur Knäuelform wird durch das Schmelzprofil und den Schmelzpunkt T_m beschrieben. Je höher T_m ist, desto stabiler ist die Helixform der DNA-Kette. T_m ist vom Salzgehalt der Lösung abhängig, sowie auch vom Gehalt an Guanin und Cytosin in der DNA. Marmur und Doty (1959) konnten eine lineare Beziehung zwischen dem GC-Gehalt und dem Schmelzpunkt feststellen, so daß aus dem T_m einer DNA-Probe ihr GC-Gehalt bestimmt werden kann. Ferner prüften wir die Renaturierung einer DNA-Probe beim langsamen Abkühlen der DNA-Lösung.

Um einen Überblick über das Verhalten nativer DNA verschiedener Herkunft während der Hitzedenaturierung und Renaturierung zu erhalten, fertigten wir Schmelzprofile von T1-, T4- und Kalbsthymus-DNA-Lösungen (Konzentration 100 $\mu\text{g/ml}$) an und maßen die Veränderung in der Extinktion während des langsamen Abkühlens.

In Abbildung 20 sieht man, daß die Schmelzprofile von T1- und T4-DNA sehr steil verlaufen, d.h. die Extinktionserhöhung verläuft in einem relativ engen Temperaturbereich verglichen mit der breiten Übergangszone von Kalbsthymus-DNA.

Wir bestimmten aus den Schmelzprofilen die Schmelzpunkte und ermittelten an Hand der von Marmur und Doty gewonnenen Beziehung zwischen dem GC-Gehalt und dem Schmelzpunkt T_m den GC-Gehalt unserer Proben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt und den Werten anderer Autoren gegenübergestellt. Es ergibt sich eine gute Übereinstimmung.

Als Maß für die Vollständigkeit der Renaturierung diente uns der Prozentsatz, zu dem nach dem Abkühlen die Ausgangsextinktion vor dem Erhitzen wieder erreicht wird. Die Werte sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Bei T1- und T4-DNA wird die Ausgangsextinktion zu über 80 % wieder erreicht, bei Kalbsthymus-DNA nur zu 56,5 %.

Um den Vorgang der Renaturierung besser beschreiben zu können, gingen wir folgendermaßen vor: Wir bestimmten den Temperaturanstieg in $^{\circ}\text{C}$, der nötig ist, um die Extinktion des Schmelzpunktes zu erreichen. Diese Temperaturdifferenz setzten wir in Beziehung zu dem Temperaturintervall, der bei der Renaturierung bis zum Wiedererreichen der Extinktion des Schmelzpunktes festzustellen ist. So ist z.B. bei T4-DNA von der Ausgangsextinktion bis zur Extinktion des Schmelzpunktes ein Temperaturanstieg von 4 $^{\circ}\text{C}$ (von 80 $^{\circ}$ auf 84 $^{\circ}\text{C}$) nötig, zum Wiedererreichen dieser

Extinktion bei der Renaturierung dagegen eine Temperaturerniedrigung von 30 °C (von 91° auf 61 °C). Die Renaturierung benötigt also eine 7,5 mal größere Temperaturdifferenz als die Denaturierung. Bei T1-DNA ließ sich dieser Faktor zu 3 und bei Kalbsthymus-DNA zu 8,7 bestimmen. Er besagt, daß die Renaturierung bei T1-DNA viel leichter von statten geht als bei T4-DNA und bei Kalbsthymus-DNA.

Voraussetzung für einen solchen Vergleich wäre streng genommen, daß die Aufheiz- und die Abkühlungsgeschwindigkeit gleich groß sind. Das war in unseren Versuchen aus technischen Gründen nicht möglich. (Aufheizzeit 45 Minuten, Abkühlungszeit 120 Minuten). Es konnte jedoch in unserem Institut gezeigt werden (M. Ullrich, pers. Mitteilung), daß, wenn man die Renaturierung bei 55 °C unterbricht und für drei Stunden die Lösung bei dieser Temperatur beläßt, sich nach weiterer Abkühlung nahezu keine Änderung der Extinktionswerte verglichen mit einer stetigen Abkühlung ergibt. Der Renaturierungsvorgang scheint also, zumindest innerhalb weiter Zeit-Bereiche, lediglich eine Funktion der Temperaturerniedrigung zu sein.

3.4.2. Schmelzpunkt und Renaturierung bestrahlter DNA-Lösungen

Es ist bekannt, daß ionisierende Strahlen einen Einfluß auf die Stabilität der Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basenpaaren haben. Nach Bestrahlung wässriger Lösungen von DNA erfolgt die Erhöhung der Extinktion schon bei tieferen Temperaturen. Damit ist eine Erniedrigung des Schmelzpunktes verbunden (Hagen und Wild, 1964).

Wir interessierten uns nun für die Strahlenempfindlichkeit der Wasserstoffbrücken wässriger Lösungen von T1-DNA im Dosisbereich bis 7,7 krad und für den Einfluß des Strahlenschadens auf die Renaturierbarkeit der DNA. In der Abbildung 21 sind die Schmelz- und Renaturierungs-

kurven von unbestrahlter DNA-Lösung (T1) und von bestrahlten DNA-Lösungen (2 krad, 4 krad und 7,7 krad) aufgetragen. Die Kurven für 1 krad wurden der Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet, da sie nahezu mit denen der Kontrolle übereinstimmen.

Zunächst stellten wir fest, daß während der Bestrahlung keine Änderung der Extinktion der Lösungen erfolgt war. Entsprechend den Befunden von Hagen und Wild (1964) begann die Erhöhung der Extinktion bei der Erwärmung schon bei tieferen Temperaturen und die Schmelzpunkte sanken mit steigenden Dosen. Der Vorgang der vollständigen Denaturierung erfolgte über einen immer breiter werdenden Temperaturbereich.

Die Renaturierung der bestrahlten DNA werteten wir mit dem in 3.4.1. beschriebenen Verfahren aus. Bei der unbestrahlten DNA und nach Bestrahlung mit 1 und 2 krad ist für die Renaturierung die 3-fache Temperaturdifferenz notwendig als für das Schmelzen (siehe Tabelle 5). Nach 4 krad beträgt dieser Faktor nur noch 2 und nach 7,7 krad 1,7. Dabei scheint der Einfluß des Strahlenschadens vorwiegend eine Verzögerung der Denaturierung zu bedingen, weniger ein leichtere Renaturierung.

Das Ausmaß der Renaturierung in Abhängigkeit von der Dosis ist ebenfalls in Tabelle 5 aufgeführt. Während die Anfangsextinktion der Kontroll-DNA etwa zu 90 % erreicht wird, wird sie bei 7,7 krad nur noch zu 75 % wieder erreicht.

3.4.3. Schmelzpunkt und Renaturierung von DNA bestrahlter Phagen

Um einen Überblick über die Strahlenempfindlichkeit der Wasserstoffbrücken der DNA in vivo zu erhalten, bestimmten wir die Schmelz- und Renaturierungskurven der aus bestrahlten Phagen isolierten DNA. Im Gegensatz zu den unter 3.4.1. und 3.4.2. beschriebenen Versuchen wurde aus technischen Gründen hier nicht bei 100 µg/ml, sondern

bei 20 $\mu\text{g/ml}$ gemessen. Die Änderung der Konzentration hat, wie aus der Abbildung 22 ersichtlich ist, auf das Schmelzverhalten der unbestrahlten DNA keinen Einfluß. Sowohl der Temperaturintervall bis zum Erreichen der Extinktion $\Delta T_{\text{Den}} = 6 \text{ }^\circ\text{C}$, als auch der Schmelzpunkt $T_m = 89,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ist der gleiche (vgl. Tabelle 5 und 6). Jedoch verläuft die Renaturierung verzögert (Faktor der Temperaturdifferenz = 4 statt 3) und die Ausgangsextinktion wird nur zu 73,3 % wieder erreicht. Die Rekombination der Einzelstränge zu einer Doppelhelixstruktur ist wahrscheinlich durch den größeren Abstand der Moleküle in der verdünnten Lösung erschwert.

Änderungen der Schmelzkurven der DNA sind nach Bestrahlung der Phagen erst nach 500 krad festzustellen (Tab. 6). Die Denaturierung setzt dann bei tieferen Temperaturen ein und der Schmelzpunkt sinkt. Die Renaturierung ist erst ab 750 krad verändert. Sie ist unvollständiger, auch benötigt sie größere Temperaturdifferenzen. Im Verhältnis zur Denaturierung wird sie jedoch weniger beeinflusst, so daß das Verhältnis der benötigten Temperaturdifferenzen geringer wird, ähnlich wie nach Bestrahlung von DNA-Lösungen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung energiereicher Strahlung auf die molekulare Beschaffenheit der DNA untersucht werden und eine Beziehung zwischen dem Strahlenschaden an der DNA und ihrer biologischen Aktivität aufgestellt werden. Dabei sollten Doppelbrüche in der DNA-Helix, eventuell auftretende inter- oder intramolekulare Vernetzungsreaktionen und Schäden der Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Einzelsträngen im Vordergrund des Interesses stehen. Als Untersuchungsmaterial wählten wir die DNA eines möglichst einfachen biologischen Objektes, welches einerseits erlaubte, direkte sowie indirekte Strah-

lenwirkungen ohne stoffwechselbedingte Sekundärprozesse zu erfassen und andererseits als Grundmodell für funktionell höher entwickelte Zellen gelten konnte. Aus folgenden Gründen erschienen uns T1-Bakteriophagen als günstiges Untersuchungsmaterial:

- a. Die biologischen Strahlenreaktionen von T1-Phagen sind schon gut untersucht worden (Hotz, 1966).
- b. Bakteriophagen haben keinen eigenen Stoffwechsel.
- c. T1-Phagen lassen sich in großen Mengen einfach gewinnen.
- d. Die biologische Aktivität, d.h. die Koloniebildungsfähigkeit, kann relativ genau und ohne großen Aufwand getestet werden.
- e. T1-DNA mit einem Molekulargewicht von 30×10^6 läßt sich einfach, d.h. ohne mechanische Degradierung isolieren und handhaben.
- f. Die DNA-Moleküle aller Phagenpartikel haben das gleiche einheitliche Molekulargewicht, so daß strahlenbedingte Veränderungen der DNA leichter erfaßbar werden und die theoretische Analyse der Befunde vereinfacht wird.

Unsere Überlegungen zu den Ergebnissen gliedern sich in vier Teile:

- 4.1. Beschreibung der Methode der Molekulargewichtsbestimmung und der Aufstellung von Sedimentations- und Molekulargewichtsverteilungen,
- 4.2. Untersuchung der molekularen Veränderungen der DNA, die in wässriger Lösung bestrahlt wurde,
- 4.3. Beschreibung der strahlenbedingten Veränderungen von DNA bestrahlter Phagen und ihre Beziehung zur biologischen Inaktivierung der Phagen,
- 4.4. Untersuchungen über die direkten und indirekten Strahlenschäden der Wasserstoffbrücken.

4.1. Beschreibung der Methode der Molekulargewichtsbestimmung und der Aufstellung von Sedimentations- und Molekulargewichtsverteilungen

4.1.1. Molekulargewichtsbestimmung

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes empfahl sich die Kombination zweier voneinander unabhängiger Untersuchungsmethoden: Viskositätsmessungen und Sedimentationsanalysen. Die Verwendung der Viskositätsmessungen allein ist unbefriedigend, da native DNA durch strahlenbedingte Ereignisse eine andere Molekülform erhalten könnte, die die Viskosität erheblich beeinflusst, ohne daß sich aber das Molekulargewicht ändert.

Die Molekülkonfiguration ist aber ohne Bedeutung, wenn man neben der Viskosität auch die Sedimentationskonstante bestimmt und aus beiden Größen das Molekulargewicht berechnet. Stärker geknäuelte Moleküle haben zwar eine geringere Viskosität als entfaltete Moleküle, sie sedimentieren aber schneller. Wie von Mandelkern und Flory gezeigt wurde, ist jedoch das Produkt $S^0[\eta]^{1/3}$ unabhängig von der Molekülform und kann zur Berechnung des Molekulargewichtes benutzt werden.

Man erhält damit allerdings nur einen Mittelwert des Molekulargewichtes, $M_{S\eta}$, der etwa dem Gewichtsmittel M_w entspricht. Zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit von Brüchen benötigt man jedoch das Zahlenmittel M_n . Bei einem statistischen Abbau der Moleküle durch die Bestrahlung ist $M_w = 2 M_n$. Liegen jedoch Vernetzungen neben den Brüchen vor, so ist $M_w > 2 M_n$. Da diese möglicherweise nach Bestrahlung auftreten, war es wünschenswert, die Verteilung der Bruchstücke der bestrahlten DNA zu bestimmen, um daraus M_w sowie auch M_n zu berechnen.

4.1.2. Sedimentations- und Molekulargewichtsverteilungen

Eine Analyse des in der Zentrifugenzelle erhaltenen Gradienten erlaubt nun die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung. Bei dieser Analyse müssen einige Korrekturen vorgenommen werden, wie im ersten Teil der Ergebnisse dargestellt wurde. Man erhält zunächst eine Verteilung der Sedimentationskonstanten des Moleküls, die für eine bestimmte Konzentration der DNA-Moleküle gilt ($S_{app,i}$ -Werte). Hierbei ist die infolge der Sektorform der Zelle stattfindende Verdünnung der DNA-Lösung bereits berücksichtigt. Es läßt sich ferner zeigen (Hagen, 1967), daß die Diffusion der Moleküle am Gradienten praktisch keine Rolle spielt, wenn man lange genug zentrifugiert. Dann wird nämlich die gleiche Verteilung erhalten wie nach einer Extrapolation der $S_{app,i}$ -Werte auf unendliche Zeit, wie für die Eliminierung der Diffusion zu fordern wäre.

Diese Verteilung der $S_{app,i}$ -Werte wird nun auf die Verteilung der S -Werte bei der Konzentration Null extrapoliert (S_i^0). Es wurde gezeigt, daß dies mit einem rechnerischen Verfahren geschehen kann, wenn die Konzentrationsabhängigkeit der Mittelwerte von S_{app} ($S_{app,0,5}$) bekannt ist. Aus der Verteilung der S_i^0 -Werte errechnet sich dann die Molekulargewichtsverteilung nach einer empirischen Gleichung $S^0 = A_s M^{B_s}$. Diese Konstanten A_s und B_s ergeben sich aus einer vergleichenden Molekulargewichtsbestimmung durch $S_{0,5}^0$ und der Viskosität. Obwohl DNA-Moleküle in dem gleichen Lösungsmittel eine ähnliche Konfiguration besitzen und deshalb A_s und B_s aus einer großen Zahl von $M_{s\eta}$ -Bestimmungen ziemlich sicher ermittelt werden kann, erwies es sich doch als zweckmäßig, durch unsere vergleichende Viskositätsmessungen die Richtigkeit der Konstanten für jedes einzelne DNA-Präparat nachzuprüfen.

Voraussetzung war allerdings eine zuverlässige Bestimmung der Viskosität. Da die großen DNA-Moleküle eine erhebliche Strukturviskosität besitzen, mußten die bei der Messung erhaltenen Daten auf die Scherkraft $\langle s \rangle = 0$ extrapoliert werden. Das war bei dem von Aten und Cohen (1965) beschriebenen Kapillarviskosimeter auch möglich, die Extrapolation war aber sehr unsicher. Wesentlich besser war das von Zimm und Crothers (1962) entwickelte Rotationsviskosimeter, bei dem die dabei auftretenden Scherkräfte so gering sind, daß sich eine Extrapolation auf $\langle s \rangle = 0$ erübrigte.

Die Beziehung von S^0 und $[\eta]$ bei einem bestimmten DNA-Präparat (vgl. Abb. 14) erlaubt, einige allgemeine Aussagen über die Molekülform zu machen. Wie sich bei der Bestrahlung von DNA-Lösungen ergab, ändert sich die Molekülform nur wenig, obwohl zahlreiche Brüche der Einzelkette, der Doppelhelix oder auch Vernetzungen auftreten. Die gemessenen Werte von S^0 und $[\eta]$ liegen auf der Mittelwertskurve von unbestrahlten DNA-Präparaten anderer Autoren (Eigner und Doty, 1965; Weinert, 1967). Offenbar wird hier die Molekülform weniger durch die Beweglichkeit des Moleküls bestimmt, als durch die Abstoßung der Ketten voneinander, die von dem verwendeten Puffer abhängig ist. Nach Bestrahlung der Phagen ergab sich allerdings für die aus ihnen isolierte DNA z.T. erhebliche Abweichungen von der Mittelwertskurve. Auf sie soll später noch eingegangen werden.

Die aus der Umrechnung von S^0 zu M erhaltenen Molekulargewichtsverteilung ermöglichte anschließend, die uns interessierenden Mittelwerte M_w und M_n zu bestimmen. Dafür wurden aus 2 - 3 Zentrifugationen mit verschiedener Konzentration jeweils 2 Aufnahmen ausgewertet. Die Übereinstimmung der einzelnen Meßpunkte (vgl. Abb. 7) bestätigte die Zuverlässigkeit des Verfahrens.

4.2. Bestimmung der Zahl der Brüche und der Vernetzungen nach Bestrahlung in wässriger Lösung

Aus den in Abbildung 7 und 8 gezeigten Molekulargewichtsverteilungen ist ersichtlich, daß nach Bestrahlung wässriger DNA-Lösungen Moleküle mit kleineren und mit größerem Molekulargewicht gebildet werden. Das legt die Vermutung nahe, daß nach den in der Einleitung beschriebenen Radikalmechanismen Brüche in der DNA-Kette entstehen (Schema 6) und sich Vernetzungen (Schema 7) ereignen.

Nach Bestrahlung in verdünnten Lösungen sind Doppelbrüche erst dann zu erwarten, wenn Brüche in der Einzelkette auftreten und diese sich entweder gegenüberliegen oder sich in der näheren Umgebung befinden. Dabei werden die zwischen den beiden Radikalstellen liegenden Wasserstoffbrücken aufgespalten. Hagen (1967) konnte zeigen, daß die Zahl der Einzelbrüche linear mit der Dosis ansteigt und daß sich bei Anhäufung der Einzelbrüche in den Einzelsträngen Doppelbrüche bilden, deren Zahl quadratisch mit der Dosis anwächst.

Die von Hagen aufgestellte Gleichung für die Bruchwahrscheinlichkeit der Doppelhelix $A = (kD + \beta)^2 n$ (3.13) ließ sich formal auf unsere Ergebnisse anwenden. Unter Verwendung der gefundenen M_n und M_w -Werte konnten Gleichungen für die Bruch- und Vernetzungswahrscheinlichkeit aufgestellt werden, in denen deren gegenseitige Beeinflussung berücksichtigt wurde (3.17; 3.18). Die berechneten Werte für A sind in Abbildung 9 für zwei Versuchsreihen in Beziehung zur Dosis aufgetragen. Doppelbrüche entstehen einmal quadratisch mit der Dosis ($n p^2 D^2$) (s. Gleichung 3.13) sowie linear mit der Dosis ($2np\beta D$). Der Anteil der Doppelbrüche, der bereits vor der Bestrahlung vorhanden war, konnte bei unseren Versuchen nicht sicher bestimmt werden und wurde nicht weiter berücksichtigt. Bei unserer Isolierungsmethode war die Wahrscheinlichkeit für das Auf-

treten solcher Brüche recht gering und für die Berechnungen vernachlässigbar (s. S. 31).

Aus Abbildung 9 ist $b = 2np^{\beta}$ (s. Gleichung 3.19) und $c = np^2$ bestimmbar (vgl. S. 33). Damit kann die Bruchrate p pro Monomer (Nukleotid) und pro rad bestimmt werden (unter der Annahme, daß $n = 7$ (Hagen, 1967)); $c = 0,80 \cdot 10^{-12}$ (1. Serie) und $c = 1,90 \cdot 10^{-12}$ (2. Serie).

Dann ist:

$$p^2 = \frac{c}{n} = \frac{0,80 \cdot 10^{-12}}{7} ; \quad p = 0,338 \cdot 10^{-6} \text{ (1. Serie)}$$

Zur Ermittlung des G-Wertes, d.h. der Zahl der durch Bestrahlung hervorgerufenen Ereignisse pro 100 eV absorbierter Energie, gehen wir von folgenden Überlegungen aus: Der G-Wert ist 1, wenn $0,62 \cdot 10^{12}$ Ereignisse pro rad und cm^3 aufgetreten sind. Die Konzentration der DNA während der Bestrahlung betrug $200 \mu\text{g/ml}$. Legt man das Molekulargewicht nativer T1-DNA zugrunde, so enthält 1 ml $4,02 \cdot 10^{12}$ DNA-Moleküle. Das mittlere Molekulargewicht eines Nukleotidpaares ist 617. Demnach enthält 1 ml DNA-Lösung $1,95 \cdot 10^{17}$ Nukleotidpaare oder $3,9 \cdot 10^{17}$ Nukleotide. Die Anzahl der Einzelbrüche pro rad und ml ist dann $0,338 \cdot 10^{-6} \times 3,9 \cdot 10^{17} = 1,32 \cdot 10^{11}$. Daraus ergibt sich ein $G_{(p)}$ -Wert für die Einzelbrüche von 0,216, d.h. pro 100 eV absorbierter Energie finden 0,216 Einzelbrüche statt. Für die 2. Serie erhält man auf entsprechende Weise den $G_{(p)}$ -Wert von 0,33.

Für die Betrachtung der Doppelbrüche im linearen Anteil der Abbildung 9 beziehen wir die Berechnungen auf die Nukleotidpaare, da an einem Doppelbruch ja beide Nukleotidstränge beteiligt sind.

Es ergibt sich dann

$$\text{für die 1. Serie mit } b = 2,57 \cdot 10^{-9} : G_{(b)} = 8,1 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{für die 2. Serie mit } b = 4,22 \cdot 10^{-9} : G_{(b)} = 1,32 \cdot 10^{-3}$$

Es sei hier nochmals betont, daß die G-Werte für die Einzelbrüche nicht durch direkte Messungen der Einzelbruchraten bestimmt wurden, sondern über die für die Entstehung der Doppelbrüche gemachten Annahmen. Dennoch sind die Werte ähnlich dem von Hagen (1967) bestimmten G-Wert von 0,27.

Der Unterschied der Strahlenempfindlichkeit der 1. und 2. Serie läßt sich nicht eindeutig erklären. Die erste Serie zeigt eine deutlich geringere Strahlenempfindlichkeit als die zweite. Es kann dazu nur bemerkt werden, daß beide Serien mit verschiedenen DNA-Präparationen durchgeführt wurden. Geringe Verunreinigungen an niedermolekularen Bestandteilen können eine gewisse Schutzwirkung übernehmen. Im gleichen Sinne könnten unterschiedliche Proteingehalte in beiden Lösungen wirken. Dieser unterschiedliche Proteingehalt verschiedener DNA-Präparate ist nicht zu vermeiden, da die Scherempfindlichkeit der DNA eine intensive Reinigung verbot.

Die in Tabelle 2 aufgeführten Werte für A und Q der zweiten Serie für N_2 und O_2 lassen keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Gasatmosphären erkennen. Auch die Form der Molekulargewichtsverteilungen unterscheidet sich nur unwesentlich. Jedoch ist auf Grund der wenigen Messungen noch nicht eindeutig, ob die Bestrahlung unter Sauerstoffatmosphäre ohne Einfluß auf das Verhältnis von Brüchen und Vernetzungen bleibt. Dazu müßte eine intensivere Begasung der Proben vielleicht auch während des Bestrahlungsvorganges gewährleistet werden. Dies stößt allerdings, wie schon erwähnt, auf technische Schwierigkeiten, da dabei die Scherkräfte möglichst gering gehalten werden sollten.

Betrachten wir die Molekulargewichtsverteilungen der 1. Serie in der Abbildung 8, so können wir annehmen, daß im Molekulargewichtsbereich unterhalb von $29 \cdot 10^6$ vorwiegend Bruchstücke unterschiedlicher Länge entstanden sind (nach Schema 6, Einleitung). Jedoch können auch diese

Moleküle teilweise vernetzt sein (Schema 7). Die resultierenden Bruchstücke können in dieser Hinsicht nicht durch eine Molekulargewichtsverteilung unterschieden werden. Bei den Molekülen oberhalb des Molekulargewichtes von $29 \cdot 10^6$ fällt auf, daß nahezu keine Moleküle mit Molekulargewichten oberhalb von $60 \cdot 10^6$ entstehen. Das wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß Brüche gegenüber den Vernetzungen überwiegen. Die Wahrscheinlichkeit für die Vernetzung zweier Moleküle ohne Bruch ist also sehr klein.

Die auftretenden Vernetzungen können nun einmal zwischen zwei verschiedenen Molekülen stattfinden, daneben könnten aber auch Vernetzungen innerhalb eines Moleküls entstehen. Nimmt man einmal an, daß die DNA-Knäuel etwa kugelförmige Gestalt haben ($V = 4/3 \pi r^3$) und sich nicht weiter als $2r$ nähern können, so kann man eine Grenzkonzentration berechnen, bei der sich die Moleküle gerade noch berühren und intermolekulare Vernetzungen gerade noch stattfinden können. Unterhalb dieser Konzentration nimmt die Wahrscheinlichkeit für intermolekulare Vernetzungen stark ab, entsprechend steigt der Anteil von intramolekularen Vernetzungen. Bei der Grenzkonzentration nehmen die Moleküle nach Rosenbloom und Schumaker (1967) 74 % des Gesamtvolumens ein. Die Autoren geben eine Formel für den "radius of gyration" an:

$$r = [717 \cdot M/200]^{1/3} / \sqrt{6}$$

Wir berechneten daraus diese Grenzkonzentration für die T1-DNA zu etwa $120 \mu\text{g/ml}$, d.h. also, daß die Moleküle bei $200 \mu\text{g/ml}$ ineinander verknäuel sein mußten. Intermolekulare Vernetzungen sind also bei dieser Konzentration wahrscheinlicher als intramolekulare Rekombination von Radikalestellen.

Aus Abbildung 10 ist ersichtlich, daß die Werte für Q zunächst linear mit der Dosis ansteigen und dann, sieht man von den zwei deutlichen Abweichungen der 2. Versuchsserie einmal ab, einen Sättigungswert erreichen. Die Anfangssteigung der Q-Werte ergibt $q = 1,5 \cdot 10^{-9}$, d.h. die Vernetzungsrate beträgt etwa die Hälfte bis ein Drittel des linearen Anteils der Doppelbrüche. Es scheint, daß Vernetzungen bei der Bestrahlung verdünnter DNA-Lösungen nur bei kleinen Dosen eine Rolle spielen. Bei höheren Dosen überwiegt der quadratische Anteil der Doppelbrüche und damit die Gesamtzahl der Brüche gegenüber den Vernetzungen. Durch die damit verbundene Verkleinerung der Molekülradien sinkt auch die Wahrscheinlichkeit einer intermolekularen Vernetzung, so daß schließlich überhaupt keine neuen Vernetzungen mehr entstehen.

Als G-Wert für Vernetzungsrate pro Nukleotid ergibt sich aus der Anfangssteigung der Q-Werte in Abb. 10: $q = 1,5 \cdot 10^{-9}$

$$G(q) = \frac{1,5 \cdot 10^{-9} \cdot 3,9 \cdot 10^{17}}{0,62 \cdot 10^{12}} = 9,45 \cdot 10^{-4}$$

Da an jedem Vernetzungsereignis zwei Monomere (Nukleotide) beteiligt sind, ist der G-Wert für die tatsächlich auftretenden Vernetzungen:

$$G = 4,7 \cdot 10^{-4}$$

Gegenüber dem Bruch der Einzelkette sind also Vernetzungen sehr selten, obwohl sie das Molekulargewicht großer DNA-Moleküle stark verändern. Vernetzungen wurden bisher nur an trocken bestrahlter DNA (Hagen und Wellstein 1965) und an DNA-Gelen beschrieben (Lett u.a. 1961, Lett und Alexander 1961). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der DNA bestrahlter Lösungen ergaben zusätzlich Hinweise, daß Vernetzungen auch in verdünnten wässrigen Lösungen entstehen (Das Gupta u.a. 1966).

4.3. Beschreibung der strahlenbedingten Veränderungen
von DNA bestrahlter Phagen in Beziehung zur
biologischen Aktivität

4.3.1. Die biologische Inaktivierung

In 3.3.1. hatten wir beschrieben, daß die Inaktivierung von T1-Phagen bei direkter Strahlenwirkung in 5 x NB und in 0,1 m Histidinlösung einer Eintreffereponentialfunktion folgt. Um Vergleiche unserer Ergebnisse mit in der Literatur angegebenen anstellen zu können, eignet sich wiederum der G-Wert. Man kann die D_{37} unter Verwendung der Masse des Bestrahlungsobjektes mit Hilfe der Gleichung

$$G = 100 \text{ eV/m} \cdot D_{37}$$

in den G-Wert umrechnen. Hierbei ist m = die Masse des T1-Phagen.

Wir konnten als Dosis, bei der noch 37 % der T1-Phagen überleben, für beide Bestrahlungsmedien den Wert $D_{37} = 95 \text{ krad}$ ermitteln. Dieser Wert befindet sich in Übereinstimmung mit dem von Hotz und Zimmer (1963) für 5 x NB angegebenen Wert. Für die Masse der DNA pro T1-Partikel ergibt sich aus dem Molekulargewicht $30 \cdot 10^6$ der Wert $0,5 \cdot 10^{-16} \text{ g}$. T1-Phagen bestehen etwa zur Hälfte aus DNA. Die Gesamtmasse des T1-Phagen m ist also $1,0 \cdot 10^{-16} \text{ g}$. Durch die Bestrahlung mit 1 rad werden in proteinhüllten Organismen $6,12 \cdot 10^{11} \cdot 10^2 \text{ eV}$ Energie absorbiert. Danach errechnet sich für die biologische Inaktivierung der Phagen bei direkter Bestrahlung ein G-Wert

$$G = \frac{100}{9,5 \cdot 10^4 \cdot 6,12 \cdot 10^{13} \cdot 1,0 \cdot 10^{-16}} = 0,172$$

Für ein Inaktivierungsereignis ist also der Energiebedarf von etwa 580 eV notwendig.

Betrachten wir nun nicht den ganzen Phagen, sondern nur die DNA als kritisches Target, so muß die Berechnung des G-Wertes auf die Masse der im Phagen befindlichen DNA mit $m = 0,5 \cdot 10^{-16}$ g bezogen werden. Es ergibt sich dann ein G-Wert:

$$G = \frac{100}{95 \cdot 6,12 \cdot 10^{16} \cdot 0,5 \cdot 10^{-16}} = 0,344$$

Der Energiebedarf für die biologische Inaktivierung der DNA im Phagen ist damit etwa 290 eV.

4.3.2. Die Bestimmung von Doppelbrüchen und Vernetzungen aus dem Gradienten

In der Abbildung 13 hatten wir die Anzahl nicht geschädigter Moleküle in Beziehung zur Prozentzahl der überlebenden Phagen aufgetragen. Die Anfangssteigung der Kurve ergab sich zu 0,33, d.h. im Dosisbereich bis etwa 50 krad treten pro inaktiviertem Phagen etwa 0,33 Doppelbrüche auf. Diese Berechnung ist jedoch nicht sehr zuverlässig, da die Anfangsneigung der Kurve nicht genau bestimmt werden kann. Zweckmäßiger ist folgende Überlegung: Nach Schulz (1942) ist der Anteil der nicht degradierten DNA $N/N_0 = e^{-AP_0}$. Dies gilt im wesentlichen auch, wenn gleichzeitig Vernetzungen entstehen. Der Anteil der weder gebrochenen noch vernetzten Moleküle ist dann:

$$N/N_0 = e^{-(AP_0 + \frac{Q}{2} 2P_0)}$$

Trägt man die aus den Gradienten ermittelten Prozentanteile der unversehrten Moleküle im halblogarithmischen Maßstab gegen die Dosis auf (Abbildung 23, halbgeschlossene Symbole), so ergibt sich eine Gerade mit der $D_{37} = 345$ krad, die flacher verläuft als die Dosiseffektkurve für die Inaktivierung der Phagen. Man erhält einen G-Wert von

$$G = \frac{100}{345 \cdot 6,12 \cdot 10^{16} \cdot 0,5 \cdot 10^{-16}} = 0,095$$

Der benötigte Energiebedarf dafür, daß entweder ein Doppelbruch oder ein Vernetzungsereignis entsteht, beträgt 1050 eV.

Aus dieser Darstellung läßt sich der Anteil der Doppelbruch- oder Vernetzungsereignisse an der Inaktivierung der DNA exakter bestimmen. Er beträgt 27,5 %.

4.3.3. Die Bestimmung von Doppelbrüchen und Vernetzungen aus den Molekulargewichtsverteilungen

Wir hatten gesehen, daß sich aus den Molekulargewichtsverteilungen mit den Gleichungen (3.17) und (3.18) die Doppelbruch- und Vernetzungsraten bestimmen lassen. Aus der Darstellung $A = f(D)$ ließ sich ein linearer Anteil $b = 2,4 \cdot 10^{-11}$ und ein quadratischer Anteil der Doppelbrüche $c = 0,107 \cdot 10^{-16}$ entnehmen. Aus der Größe b , die als Anfangssteigung der Funktion $A = f(D)$ unabhängig von der Dosis ist, läßt sich ein Mindestwert für den G-Wert der Doppelbrüche berechnen:

$$G = 0,039$$

Der benötigte Energiebedarf beträgt 2560 eV. Diese linear mit der Dosis steigende Anzahl an Doppelbrüchen tragen etwa 11,3 % zu der Inaktivierung der DNA bei.

Schwieriger ist die Bestimmung der Doppelbrüche, die quadratisch mit der Dosis zunehmen. Berechnet man aus c die Dosiseffektkurve der Doppelbrüche, die quadratisch mit der Dosis erfolgen, so kann man in grober Näherung aus der Steigung der Kurve im Bereich von 700 - 1000 krad, in dem dieser Doppelbruchanteil stark ins Gewicht fällt, den G-Wert berechnen

$$G = 0,030$$

Dieser G-Wert kann allerdings nur als Orientierungswert für den quadratischen Anteil der Doppelbrüche dienen.

Aus der Darstellung der Vernetzungsrates gegen die Dosis konnten wir $q = 0,5 \cdot 10^{-11}$ ermitteln. Hieraus kann der G-Wert für die an den Vernetzungen beteiligten Nukleotide bestimmt werden:

$$G = 0,0157$$

Da an jedem Vernetzungsereignis zwei Monomere (= Nukleotide) beteiligt sind, ist der G-Wert für die tatsächlich auftretenden Vernetzungen:

$$G = 0,008$$

Der hierfür erforderliche Energiebedarf beträgt 12 700 eV. Der Anteil der Vernetzungsereignisse an der biologischen Inaktivierung ist demnach etwa 2,3 %. Trotz der Fehler, die bei der Bestimmung dieses Strahlenschadens auftreten (siehe Abbildung 19), kann man jedoch sagen, daß dieser Strahlenschaden gegenüber den Doppelbrüchen nur einen geringen Einfluß auf den Inaktivierungsmechanismus besitzt.

In 3.3.3. hatten wir beschrieben, daß einige der von uns gemessenen $S_{20,w}^0$, $0,5$ und $[\eta]$ -Werte stark von der durchgezogenen Kurve in Abbildung 14 abweichen. Es müßte noch geprüft werden, ob dieses abweichende thermodynamische Verhalten dieser DNA-Präparationen nicht auch auf Verklebungen der DNA mit dem Hüllprotein des Phagen während der Bestrahlung zurückzuführen ist. Dazu müßten die DNA-Präparationen nach dem Isolierungsprozeß mit einem proteinabbauenden Enzym behandelt werden, wodurch die verklebten Proteinreste an der DNA schonender als durch weitere Phenolbehandlungen abgetrennt werden könnten.

Berechnet man mit Hilfe der aus den Molekulargewichtsverteilungen gewonnenen Größen A und Q die Anzahl der nicht geschädigten Moleküle nach $N/N_0 = e^{-(AP_0 + QP_0)}$ und trägt diesen Wert halblogarithmisch gegen die Dosis auf (Abbildung 23, offene Symbole), so ergibt sich eine Schulterkurve. Hier kommt der quadratische Anteil der Doppelbrüche zum Vorschein. Es ist allerdings nicht er-

wiesen, ob dieser ebenso durch die Entstehung benachbarter Einzelbrüche bedingt ist, wie bei Bestrahlung wässriger DNA-Lösungen oder ob zwei Primärionisationen auch bei einer anderen räumlichen Anordnung zum Doppelbruch führen.

4.3.4. Kritik der Auswertung

Aus der Abbildung 23 ist ersichtlich, daß die Dosiseffekt-kurven, die einmal durch die Auswertung der Gradienten und einmal durch die Auswertung der Molekulargewichtsverteilungen gewonnen wurden, voneinander abweichen. Betrachtet man die Abbildungen 12, a, b, so läßt sich erkennen, daß die Bestimmung des geradlinigen Anteils des Gradienten mit erheblichen Fehlermöglichkeiten verbunden ist (siehe 3.3.2.). Wahrscheinlich wird dieser Anteil zu gering eingeschätzt.

Bei der Auswertung der Molekulargewichtsverteilung ergeben sich ebenfalls Fehlermöglichkeiten. In der Abbildung 24 haben wir zum Vergleich die Molekulargewichtsverteilungen einer mit 4 krad bestrahlten DNA-Lösung (geschlossene Symbole) und die Verteilung von DNA, die aus mit 350 krad bestrahlten Phagen isoliert wurde, aufgetragen. Es fällt auf, daß besonders nach Bestrahlung in vivo beide Verteilungen nicht mit $M_i = 0$ beginnen, d.h. daß sehr kleine Molekül-Bruchstücke nicht in Erscheinung treten. Nach der theoretischen Ableitung einer Molekulargewichtsverteilung für statistisch abgebaute Polymere (Schulz 1942) sind jedoch auch bei kleinen Abbauraten sehr kleine Bruchstücke mit Molekulargewichten bis $M_i = 0$ zu erwarten. Berechnet man einmal an einer theoretischen Verteilungskurve den M_n - und den M_w -Wert und daraus die Werte für A und Q nach (3.17) und (3.18) unter Vernachlässigung der kleinen Molekül-Bruchstücke, so ergibt sich, daß dadurch die Bruchrate stark herabgesetzt wird, wodurch die Dosiseffekt-kurve flacher verläuft. Es ergibt sich weiter, daß durch diesen Fehler keine Erhöhung der Vernetzungsrate auftritt. Deshalb ist nicht anzunehmen, daß Vernetzungen durch die Vernachlässigung der kleinen Bruchstücke vorgetäuscht

werden. Es kann jedoch nicht entschieden werden, ob in unserem Falle sehr kleine Bruchstücke nicht auftreten oder aber bei der Auswertung der UV-Aufnahmen zur Aufstellung der Molekulargewichtsverteilungen nicht erfaßt werden können.

Eine gewisse Kontrolle über diese Fehlermöglichkeit ist auch mit Hilfe der Werte von M_w möglich. Bei einer Vernachlässigung kleiner Bruchstücke wird nämlich M_w nur wenig beeinflußt. Bei einem statistischen Abbau eines Kettenmoleküls sind die Veränderungen von $\frac{1}{M_n}$ doppelt so groß wie die von $\frac{1}{M_w}$. Beim Vorliegen von Vernetzungen erhöht sich dieser Faktor. Solange also die Veränderungen von $\frac{1}{M_n}$ nicht wesentlich unter dem doppelten Betrag der Veränderung von $\frac{1}{M_w}$ liegt, sind die Fehler von M_n nicht zu groß. Entsprechende Beobachtungen ließen sich an unserem Untersuchungsmaterial auch machen.

Nehmen wir einmal an, daß die Kurve in Abb. 23, die nach der zweiten Methode gewonnen wurde, bei hohen Dosen (etwa ab 500 krad) in einen geradlinigen Anteil einmündet (was durch die wenigen Meßpunkte nicht als gesichert gelten kann), so erhält man durch Parallelverschiebung des geradlinigen Anteils durch den Nullpunkt erneut eine Gerade mit der $D_e = 450$ krad. Unter Berücksichtigung der Fehlermöglichkeiten beider Methoden würde dies bedeuten, daß, nachdem sich die anfänglichen Strahlenschäden in der DNA manifestiert haben, die Strahlenempfindlichkeit bei hohen Dosen einen konstanten Wert annimmt, der nahe an dem der Gradientenmethode liegt. Hieraus läßt sich ein G-Wert für die Schäden nach hohen Dosen bestimmen:

$$G = 0,072$$

Der Energieaufwand beträgt 1390 eV. Dieser Schaden würde mit etwa 21 % an der biologischen Inaktivierung der DNA beteiligt sein.

4.3.5. Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse

Für Schadensereignisse an DNA nach direkter Bestrahlung liegen nur wenige zuverlässige Werte vor (siehe Tabelle 7). Vergleichbare G-Werte für Doppelbrüche nach Bestrahlung trockener DNA erhalten Lett u.a. (1961) und Hagen und Wellstein (1965) ($G = 0,125$ bzw. $0,110$). Einen ähnlichen Wert finden Lett und Alexander (1961) mit $G = 0,160$ nach Bestrahlung von DNA-Gelen, wobei aber indirekte Strahlenschäden nicht ausgeschlossen werden können. Inwieweit diese Ergebnisse mit direkter Strahlenwirkung nach Bestrahlung von DNA in vivo zu vergleichen sind, bleibt dahingestellt. Weinert und Hagen (1967) bestrahlten DNA in einem Nukleoproteingel. Diese Versuchsbedingungen entsprechen annähernd den Verhältnissen, wie sie in der lebenden Säugertierzelle anzutreffen sind. Die G-Werte $G = 0,02 - 0,03$ sind in ihrer Größenordnung mit den von uns gefundenen vergleichbar. Allerdings sind in unseren Werten teilweise die Vernetzungen einbezogen, die jedoch wegen ihres geringen Anteils bei den Vergleichen nicht stören.

Mit dem von Freifelder (1965) angegebenen Wert $D_{37} = 84$ krad und mit dem vom Autor nach dem Gradientenverfahren ermittelten Wert von $0,4$ Brüchen pro inaktiviertem T7-Phagen ergibt sich unter Berücksichtigung der Masse von T7-DNA ($m = 0,6 \cdot 10^{-16}$ g nach Stent, 1963) ein G-Wert von $0,13$. Wir erwähnten jedoch in 3.3.3., daß hier nur Bruchraten bis etwa 70 % der Phageninaktivierung berücksichtigt wurden. Die geradlinige Extrapolation der Doppelbruchrate auf 100 % der Phageninaktivierung erscheint uns nicht gesichert und nicht gerechtfertigt. Dennoch ist der Wert mit dem von uns mit der Gradientenauswertung gefundenen Wert vergleichbar, da die Fehler bei der Auswertung relativ groß sind. Freifelder erklärt die 60 % "anderen Schäden" mit dem Auftreten von Basenzerstörungen. Ein Beweis wird nicht direkt erbracht. Auf Grund unserer Ergebnisse sind Vernetzungsereignisse, die erst nach längerer Zentrifugation im UV-Gradienten deutlich

werden, neben eventuell auftretenden Basenschäden ebenfalls an der Phageninaktivierung beteiligt. Der von uns berechnete G-Wert von 0,095 gilt entsprechend für Bruch- und Vernetzungsschäden der DNA.

Abschließend können wir auf Grund unserer Ergebnisse feststellen, daß etwa 0,21 - 0,27 Doppelbrüche und etwa 0,02 Vernetzungsereignisse an der biologischen Inaktivierung der DNA beteiligt sind. Die Vernetzungen tragen also relativ wenig zum biologischen Strahlenschaden bei, obwohl sie die hydrodynamischen Eigenschaften der DNA z.T. beträchtlich beeinflussen können. Es müssen also noch andere Schäden eintreten. Hier kommen in erster Linie Einzelbrüche und Basenzerstörungen in Frage.

4.4. Untersuchungen über indirekte und direkte Strahlenschädigungen der Wasserstoffbrücken

4.4.1. Schmelz- und Renaturierungsverhalten von DNA verschiedener Herkunft

Die Helixstruktur der beiden komplementären DNA-Stränge wird von den Wechselkräften der π -Elektronen zwischen den parallel übereinander geschichteten Basen der DNA-Helix und den zwischen den komplementären Basen Adenin (A)-Thymin (T) und Guanin (G) - Cytosin (C) bestehenden Wasserstoffbrücken aufrecht erhalten. Da zwischen A und T zwei, zwischen C und G jedoch drei Wasserstoffbrücken liegen, tragen die Basen C und G einen größeren Energiebetrag zur Stabilität der Doppelhelix bei als die Basen A und T.

Der Vorgang der Denaturierung nativer DNA mit Erhöhung der Temperatur besteht aus verschiedenen Schritten (Szybalski 1967). Die doppelsträngige Struktur der DNA (Form A) geht zunächst über in eine intermediäre Form (Form B), in der die Wasserstoffbrücken mehr oder weniger aufgebrochen sind, in der also partiell denaturierte Zonen vorliegen. Die Helixstruktur ist jedoch hierin noch

weitgehend erhalten. Bei weiterer Temperaturerhöhung erfolgt dann die vollständige Trennung in die beiden Einzelstränge, die, bei schneller Abkühlung auf 0 °C oder Formaldehyd Zugabe in eine Knäuelform übergeht (Form D). Dabei ist der Schritt von A nach B reversibel, der Schritt von B nach C nur unter gewissen Bedingungen teilweise reversibel, der Schritt von C nach D nicht mehr reversibel.



Die Extinktion der Lösung bei 260 m μ wächst nun in dem Maße, in dem die Reaktion von A über B nach C fortschreitet, also während die sekundäre Struktur der DNA-Helix mit dem Aufbrechen der Wasserstoffbrücken und mit der Aufhebung der π -Elektronenwechselwirkung zwischen den Basen zusammenbricht. Der Schmelzpunkt T_m , d.h. die Temperatur, bei der die Hälfte der Extinktionserhöhung erfolgt ist, steigt dabei linear mit zunehmendem CG-Gehalt an (Marmur und Doty 1959, 1962), so daß aus der Schmelzpunktbestimmung einer DNA ihr CG-Gehalt bestimmbar ist. Unsere Ergebnisse an T1-, T4- und Kalbsthymus-DNA zeigen, daß mit dieser Bestimmungsmethode sehr genaue Werte erhalten werden können (siehe Tabelle 3).

Die Breite des Überganges der Extinktionserhöhung mit der Temperatur hängt davon ab, ob die vier Basen über den DNA-Strang homogen verteilt sind, oder ob im Strang Bereiche mit Anhäufungen von AT oder CG existieren (Inhomogenitätsbereiche). Häufungsstellen von AT verschieben die Anfangstemperatur des Schmelzvorganges nach tieferen Temperaturen. Entsprechend wird durch CG-Anhäufungen die Endtemperatur der Erhöhung der Extinktion nach höheren Temperaturen verschoben. Je breiter eine solche Schmelzkurve verläuft, desto mehr Inhomogenitätsbereiche befinden sich im DNA-Molekül. Marmur und Doty (1959) zeigten an Kalbsthymus-DNA, daß ein und dasselbe Molekül Komponenten mit unterschiedlichem Schmelzpunkt aufweist. Entsprechende Befunde

wurden von Kit (1960) beschrieben. Inman (1966) zeigte an der DNA des Phagen λ , daß das Öffnen von Wasserstoffbrücken bei einer bestimmten Temperatur an bestimmte Bereiche geknüpft ist, von denen aus eine partielle Auftrennung der beiden Komplementärstränge vor sich geht. Diese Bereiche sind gleichbedeutend mit Häufungsstellen von A und T.

Die Abbildung 20 verdeutlicht die Verhältnisse an T1-, T4- und Kalbsthymus-DNA. Sie zeigt die auf Inhomogenitätsbereiche zurückzuführende breite Übergangszone von Kalbsthymus-DNA im Vergleich zu dem relativ steilen Anstieg bei T1- und T4-DNA. Die Werte für den benötigten Temperaturintervall zur Denaturierung ΔT_{Den} in Tabelle 4 lassen darauf schließen, daß sich auch in der T1-DNA größere Inhomogenitätsbereiche befinden.

Die Kettenlänge der DNA hat nahezu keinen Einfluß auf die Höhe der Schmelztemperatur und die Breite der Übergangszone. Marmur und Doty (1962) vergleichen die Schmelzprofile von unbehandelter und von einer auf 1/12 des ursprünglichen Molekulargewichtes degradierten DNA. Die Kurve der degradierten Probe weicht nur unwesentlich von der der unbehandelten Probe ab.

Entsprechend der größeren Reaktionsfähigkeit der Basen Cytosin und Guanin mit Formaldehyd wird eine denaturierte DNA-Helix mit hohem CG-Gehalt schneller und vollständiger renaturieren als denaturierte DNA-Moleküle mit höherem AT-Gehalt. Diese Abhängigkeit ist auch tatsächlich beobachtet worden (z.B. Eigner und Doty 1965). Auf der anderen Seite wird die Fähigkeit zu Renaturieren auch abhängig sein von möglicherweise vorhandenen Inhomogenitätsbereichen der Basen, unabhängig von einem vorliegenden hohen CG-Gehalt.

Nehmen wir an, daß Inhomogenitätsbereiche hohen CG-Gehaltes sich beim Abkühlen schnell und leicht zu einer partiellen Doppelhelixstruktur zusammenfinden, so ist die Wahrchein-

lichkeit dafür groß, daß die übrigen Molekülbereiche auf Grund der schon erfolgten Fixierung einiger Molekülabschnitte in beiden Strängen, sich unregelmäßig oder überhaupt nicht komplementär zusammenlagern können. Die Renaturierung wird also, auch wenn ein hoher CG-Gehalt im Gesamtmolekül vorliegt, unvollständiger verlaufen als bei Molekülen mit homogener Basenverteilung. Sie werden also auch bei vollständiger Abkühlung eine erhöhte Extinktion verglichen mit der Extinktion der unbehandelten Kontrolle aufweisen.

Vergleicht man die Renaturierungskurven von T1- und T4-DNA, so sieht man, daß infolge des geringen CG-Gehaltes der T4-DNA die Renaturierung auf einen bestimmten Endwert der Extinktion über einen viel weiteren Temperaturbereich verläuft als bei T1-DNA. Doch wird auch bei T4-DNA nahezu das gleiche Ausmaß der Renaturierung allerdings erst nach völliger Abkühlung auf 25 °C wieder erreicht. Der höhere CG-Gehalt der T1-DNA bewirkt, daß die Renaturierung bei T1-DNA viel leichter vonstatten geht als bei T4-DNA.

Ganz anders verläuft die Renaturierungskurve von Kalbsthymus-DNA. Entsprechend dem CG-Gehalt könnte man erwarten, daß die Kurve zwischen den Kurven von T4- und T1-DNA liegen müßte, jedoch geht hier die Renaturierung über einen noch größeren Temperaturbereich und erreicht auch nicht angenähert das Ausmaß der Renaturierung wie T1- oder T4-DNA. Beides läßt sich nur durch den Einfluß einer nicht homogenen Basenverteilung über das Gesamtmolekül erklären. Bei nativen DNA-Lösungen scheint demnach der Verlauf und das Ausmaß der Renaturierung ein wesentliches Kriterium für das Vorhandensein von Inhomogenitätsbereichen darzustellen.

4.4.2. Schmelz- und Renaturierungsverhalten bestrahlter DNA-Lösungen und von DNA bestrahlter Phagen

Eine Deutung des Verlaufes der Schmelzprofile in Abbildung 21 kann von zwei Seiten versucht werden.

1) Untersuchungen von M. Ullrich (1967) an bestrahlten Lösungen von Kalbsthymus-DNA zeigen, daß durch ionisierende Strahlen in der DNA-Helix begrenzte Zonen mit aufgebrochenen Wasserstoffbrücken entstehen. Es liegt nahe, daß diese Zonen auch in bestrahlter T1-DNA auftreten können. Dadurch wäre die DNA teilweise schon in die Form B des Denaturierungsschemas (s. S. 7) übergegangen. Beim Erhitzen beginnt von diesen Zonen die weitere Aufspaltung der beiden Komplementärstränge schon bei tieferer Temperatur. Man könnte sich vorstellen, daß diese Zonen vorwiegend an Inhomogenitätsstellen der leichter trennbaren AT-Basen gebunden sind, da sonst die Schmelzprofile der bestrahlten Proben parallel zu dem der unbestrahlten Kontrolle verlaufen müßten und sich der benötigte Temperaturintervall ΔT_{Den} zur Denaturierung mit steigenden Dosen nicht erhöhen dürfte (s. Tabelle 5). In diesen durch Strahlung gebildeten Zonen mit aufgebrochenen Wasserstoffbrücken müßte jedoch noch eine planare Basenaufstockung vorliegen, da, wie wir festgestellt haben, sich die Extinktion während der Bestrahlung noch nicht geändert hatte.

2) Eine andere Möglichkeit der Erklärung wären die durch die Bestrahlung entstandenen Einzelbrüche. Sie können die Verschiebung des Schmelzpunktes und den bei tieferen Temperaturen einsetzenden Schmelzvorgang dadurch bedingen, daß die Stabilität der Helix in Längsrichtung geringer wird, so daß die geschädigten Molekülketten sich schon durch geringeren Temperatureinfluß voneinander trennen lassen. Auch würde sich durch Einzelbrüche in der Helix die Extinktion der DNA-Lösungen nicht ändern.

Es sind natürlich auch beide Möglichkeiten denkbar, um die strahlenbedingte Verschiebung des Schmelzpunktes zu erklären.

Die Tabelle 5 zeigt, daß bei unbestrahlter DNA und nach Bestrahlung mit 1 und 2 krad für die Renaturierung die 3-fache Temperaturdifferenz notwendig ist als für das Schmelzen. Nach höheren Dosen nimmt dieser Faktor immer weiter ab. Der Einfluß des Strahlenschadens scheint sich vorwiegend auf eine Verzögerung der Denaturierung auszuwirken, weniger dagegen auf den Renaturierungsvorgang.

Die Abnahme des Ausmaßes der Renaturierung mit steigenden Dosen läßt sich nicht mit dem Auftreten empfindlicher Zonen erklären, denn die Basen dieser Bereiche sollten sich nach erfolgter Denaturierung beim Abkühlen nicht weniger gut wieder zu komplementären Doppelstrangbereichen zusammenlagern können als die Basen unbestrahlter DNA. Der Einfluß der Einzelbrüche ist hier naheliegender. Nach vollständiger Denaturierung liegen Einzelketten unterschiedlicher Länge vor, die sich bei der Renaturierung unvollständig zusammenlagern. Es ist vorstellbar, daß nach Abkühlung teilweise Moleküle mit einsträngigen Bereichen vorliegen. Diese würden die wachsende Unvollständigkeit der Renaturierung mit steigenden Dosen erklären.

Es ist nicht wahrscheinlich, daß Doppelbrüche einen Einfluß auf die Form der Kurven ausüben, da durch sie kürzere Ketten entstehen, die, wie wir schon erwähnten (s. S. 68), zumindest den Verlauf der Schmelzkurven nicht beeinflussen.

Die Schmelz- und Renaturierungskurven der unter Sauerstoff bestrahlten DNA-Proben decken sich völlig mit den in der Abbildung 21 gezeigten Kurven. Dies würde bedeuten, daß bei Bestrahlung der DNA in wässriger Lösung im System der Wasserstoffbrücken kein Sauerstoffeffekt beobachtet werden kann.

Die in Abbildung 22 gezeigten Schmelz- und Renaturierungskurven für DNA bestrahlter Phagen zeigen, daß Schäden in den Wasserstoffbrücken erst bei sehr hohen Dosen deutlicher hervortreten. Die Form der Kurven während der Denaturierung, die unvollständigere Renaturierung sowie das Abnehmen des Quotienten der benötigten Temperaturdifferenzen von Renaturierung und Denaturierung mit steigenden Dosen (s. Tab. 6) lassen auf ähnliche Mechanismen wie bei der Bestrahlung verdünnter DNA-Lösungen schließen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, die Wirkung ionisierender Strahlung auf die molekulare Beschaffenheit der DNA zu beschreiben und eine Beziehung zwischen Strahlenschaden an der DNA und ihrer biologischen Aktivität aufzustellen. Es werden Doppelbrüche, inter- und intramolekulare Vernetzungen und Schäden der Wasserstoffbrücken an DNA des Bakteriophagen T1 untersucht.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes werden Sedimentations- und Viskositätsmessungen herangezogen. Eine genaue Analyse der Sedimentationsgradienten erlaubt die Aufstellung von Sedimentationsverteilungen bestrahlter und unbestrahlter DNA. Es wird ein rechnerisches Verfahren zur Extrapolation der bei verschiedenen DNA-Konzentrationen erhaltenen Verteilungen der Sedimentationswerte auf die Konzentration Null beschrieben. Aus den in Molekulargewichtsverteilungen umgewandelten Sedimentationsverteilungen werden die Gewichts- und Zahlenmittel der Molekulargewichte bestrahlter und unbestrahlter DNA berechnet und die Bruch- und Vernetzungsraten bestrahlter DNA-Proben bestimmt.

Für T4-DNA wird ein Molekulargewicht von $115 \cdot 10^6$ und für T1-DNA ein Molekulargewicht von $30 \cdot 10^6$ bestimmt.

Nach Bestrahlung wässriger T1-DNA-Lösungen (Konzentration 200 µg/ml) lassen sich Doppelbrüche und intermolekulare Vernetzungen nachweisen. Die Zahl der Doppelbrüche steigt linear sowie quadratisch zur Dosis an. Der G-Wert für die lineare Komponente beträgt etwa $1 \cdot 10^{-3}$, nach höheren Dosen überwiegt die Degradierung durch die quadratische Komponente. Die Vernetzungen steigen zunächst linear mit der Dosis an, der G-Wert beträgt $0,47 \cdot 10^{-3}$. Bei höheren Dosen (ab 2 krad) scheinen keine zusätzlichen Vernetzungen mehr aufzutreten, die Vernetzungsrates bleibt konstant. Obwohl Einzelbrüche nicht gemessen werden, kann für sie auf rechnerischem Wege ein G-Wert zwischen 0,22 und 0,33 ermittelt werden.

Nach Bestrahlung ganzer Phagen in Nährbouillon und in 0,1 m Histidinlösung findet sich eine D_{37} von 95 krad. Der G-Wert für die biologische Inaktivierung der DNA ist 0,344. Nach zwei verschiedenen Auswerteverfahren ergeben sich für ein Doppelbruch- oder ein Vernetzungsereignis G-Werte zwischen 0,072 und 0,095. Intermolekulare Vernetzungen werden mit einem G-Wert von 0,008 nachgewiesen. An der biologischen Inaktivierung sind Doppelbrüche mit 21 bis 27 % und Vernetzungen nur mit etwa 2 % beteiligt.

Auf Grund von Schmelzpunktbestimmungen werden die Mol-Prozente an Guanin und Cytosin in der DNA von T1- und T4-Bakteriophagen und in Kalbsthymus-DNA bestimmt. Das Schmelz- und Renaturierungsverhalten bestrahlter wässriger T1-DNA-Lösungen und von DNA bestrahlter T1-Phagen wird untersucht. In beiden Fällen scheint sich der Strahlenschaden vorwiegend auf einen früheren Beginn der Denaturierung auszuwirken, weniger dagegen auf den Renaturierungsvorgang.

6. Literaturverzeichnis

Adams, M.H. (1950)

Methods of study of bacterial viruses.

In: "Methods in Medical Research". (ed. J.H. Comroe)

The Year Book Publish. Inc., Chicago, vol. 2

Adams, M.H. (1959)

Bacteriophages.

Interscience Publish. Inc., New York

Alexander, P., and J.T. Lett (1960)

Role of oxygen in the crosslinking and degradation
of deoxyribonucleic acid by ionizing radiation.

Nature 187, 933

Aten, J.B.T., and J.A. Cohen (1965)

Sedimentation-viscosity studies of high molecular
weight DNA.

J. Mol. Biol. 12, 537

Bresch, C. (1952)

Unterscheidung verschiedener Bakteriophagentypen
durch Farbindikatornährböden.

Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde,

Infektionskrankheiten und Hygiene I Orig. 159, 47

Bresler, S.E., N.A. Kiselev, V.F. Maniakov, M.J. Mosevitski

and A.L. Timovski (1967)

Isolation and physicochemical investigation of T1
bacteriophage DNA.

Virology 33, 1

Butler, J.A.V. (1956)

The action of ionazing radiations on biological
materials.

Rad. Res. 4, 20

Cantow, H.J. (1959)

Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung durch Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei Flory-Temperaturen.
Makr. Ch. 30, 169

Chargaff, E. (1955)

Isolation and composition of the deoxyribose nucleic acid and the corresponding nucleoproteins.

In: The nucleic acids

(ed. E. Chargaff and J.N. Davidson)

Academic Press, New York Vol. I, 308

Charlesby, A. (1960)

Atomic radiation and polymers.

Pergamon Press, Oxford

Chen, P.S., T.Y. Toribara, and H. Warner (1956)

Mikrodetermination of phosphorus.

Analyt. Chem. 28, 1756

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

Crothers, D.M., and B.H. Zimm (1965)

Viscosity and sedimentation of the DNA from bacteriophages T2 and T7 and the relation to molecular weight.

J. Mol. Biol. 12, 525

Das Gupta, N.N., M. Sarkar and D.N. Misra (1966)

Electron microscopic studies on denatured DNA from Escherichia coli.

J. Mol. Biol. 15, 619

Davis, M. (1953)

Irradiation of T1-bacteriophage with low-voltage electrons.

Arch. Bioch. and Biophys. 49, 417

Eigner, J., and P. Doty (1965)

The native, denatured and renatured states of deoxy-
ribonucleic acid.

J. Mol. Biol. 12, 549

Freifelder, D. (1965)

Mechanism of inactivation of coliphage T7 by X-rays.

Proc. N.A.S. 54, 128

Hagen, U. und R. Wild (1964)

Untersuchungen über Strahlenempfindlichkeit der DNS.

I. Die Empfindlichkeit der Wasserstoffbrücken.

Strahlentherapie 124, 215

Hagen, U. und H. Wellstein (1965)

Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der
DNS.

III. Brüche und Vernetzungen nach direkter Bestrahlung.

Strahlentherapie 128, 565

Hagen, U. (1967)

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

Biochim. Biophys. Acta 134, 45

Henglein, A., and W. Schnabel (1966)

Radiation chemistry of synthetic macromolecules in
solution, LET effects.

In: "Current topics in radiation research". (ed. M.
Ebert and A. Howard)

North-Holland Publish. Comp., Amsterdam, vol. II

Hotz, G., and K.G. Zimmer (1963)

Experiments in radiation chemistry of T1-phage.

Int. J. Radiation Biol. 7, 75

Hotz, G. (1966)

Habilitationsschrift, Karlsruhe

Hutchinson, F., and J. Arena (1960)

Destruction of the activity of deoxyribonucleic acid
in irradiated cells.

Rad. Res. 13, 137

Inman, R.B. (1966)

A denaturation map of the λ phage DNA molecule deter-
mined by electron microscopy.

J. Mol. Biol. 18, 464

Kaplan, H.S. (1966)

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

Proc. N.A.S. 55, 1442

Kit, S. (1960)

Compositional heterogeneity of normal and malignant
tissue deoxyribonucleic acids (DNA).

Biochim. Biophys. Res. Comm. 3, 361

Lea, D.E. (1946)

Actions of radiations on living cells.

Univ. Press, Cambridge

Lett, J.T., and P. Alexander (1961)

Crosslinking and degradation of deoxyribonucleic
acid gels with varying water contents when irradiated
with electrons.

Rad. Res. 15, 159

Lett, J.T., K.A. Stacey and P. Alexander (1961)

Crosslinking of dry deoxyribonucleic acids by electrons.

Radiat. Res. 14, 349

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., and P. Doty (1959)
Heterogeneity in deoxyribonucleic acids.
Nature 183, 1427
- Marmur, J., and P. Doty (1962)
Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature.
J. Mol. Biol. 5, 109
- Oth, A. (1959)
Denaturation or dissoziation of deoxyribonucleic acid in dilute Solution.
Biochim. Biophys. Acta 35, 216
- Peacocke, A.R. (1960)
The structure and physical chemistry of nucleic acids and nucleoproteins.
Progr. Biophys. Chem. 10, 56
- Rosenbloom, J., and V. Schumaker (1967)
Molekular weight dependence of the rotor speed induced aggregation of deoxyribonucleic acid.
Biochemistry 6, 276
- Schulz, G.V. (1942)
Über die Molekulargewichtsverteilungen, die beim Abbau von Stoffen mit Kettenmolekülen auftreten.
(Zur Kinetik des Abbaues von Kettenmolekülen. II.)
Z. Phys. Chem. 51 (B), 127

- Schumaker, V.N., and H.K. Schachman (1957)
Ultracentrifugical analysis of dilute solutions.
Biochim. Biophys. Acta 23, 628
- Shooter, K.V., and J.A.V. Butler (1956)
Sedimentation of deoxyribonucleic acid at low
concentrations.
Trans. Farad. Soc. 52, 734
- Sinsheimer, R.L. (1960)
The nucleic acids of bacterial viruses.
In: The nucleic acids
(ed. E. Chargaff and N.J. Davidson)
Academic Press, New York Vol. III, 187
- Stent, G.S. (1963)
Molekular biology of bacterial viruses.
W.H. Freeman and Company San Francisco and London.
- Stuy, J.H. (1961)
Radiation inactivation of intracellular transformig
deoxyribonucleic acid.
Proefschrift, Utrecht
- Subirana, J.A. (1965)
The irreversible denaturation of bacteriophage deoxy-
ribonucleic acid.
Biochim. Biophys. Acta 103, 13
- Szybalski, W. (1967)
Effects of elevated temperatures on DNA and some
polynucleotides: denaturation, renaturation and
cleavage of glycosidic and phosphate ester bonds.
In: "Thermobiology" (ed. A.H. Rose)
Academic Press, London and New York
- Thomas, C.A., and K.J. Berns (1961)
The physical characterization of DNA molecules
released from T2 and T4 bacteriophage.
J. Mol. Biol. 3, 277

Timoféeff-Ressovsky, N.W. und K.G. Zimmer (1947)
Biophysik I. Das Trefferprinzip in der Biologie.
S. Hirzel, Leipzig

Ullrich, M. (1967)
Über die Strahlenempfindlichkeit der Wasserstoffbrücken
in der Desoxyribonukleinsäure.
Dissertation Universität Karlsruhe

Watson, J.D. (1950)
The properties of X-ray-inactivated bacteriophage.
I. Inactivation by direct effect.
J. Bacteriol. 60, 697

Watson, J.D. (1952)
The properties of X-ray-induced bacteriophage.
II. Inactivation by indirect effects.
J. Bacteriol. 63, 473

Weinert, H. und U. Hagen (1967)
Über die Strahlenempfindlichkeit der Desoxyribo-
nukleinsäure im Chromatin.
Strahlentherapie, im Druck

Weiss, J.J. (1964)
Chemical effects of ionizing radiation on nucleic
acids and related compounds.
Progress in Nucleic Acid Res. 3, 103

Zimm, B.H., and D.M. Crothers (1962)
Simplified rotating cylinder viscometer for DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 905

7. Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Charakterisierung unbestrahlter und bestrahlter T1-DNA sowie Bruch- und Vernetzungsraten bestrahlter DNA (1. Serie)

Dosis	Konzentration [µg/ml]	$M_w \cdot 10^{-6}$	$M_n \cdot 10^{-6}$	$A \cdot 10^6$	$Q \cdot 10^6$	$S_{20,w,0,5}^0$	$[\eta]$ [dl/g]	$M_{s\eta} \cdot 10^{-6}$	K_s	A_s
KONTROLLE	6,35	29,56	29,56			33,3	165,0*	30,49	0,695	0,031
	6,35	27,77	27,77							
	11,50	28,73	28,73							
	11,50	28,16	28,16							
	29,70	27,73	27,73							
	29,70	27,59	27,59							
Mittelwert		28,26	28,26							
1 kR	4,70	30,27	28,68	0,58	0,88	35,7	130,4	30,22	0,928	0,0334
	4,70	27,82	27,09	1,04	0,16					
	11,30	31,33	25,65	4,40	2,16					
	11,30	29,98	24,04	5,94	2,10					
		29,85	26,36	2,99 ±1,30	1,33 ±0,39					
Mittelwert										
2 kR	5,65	26,64	24,37	3,34	0,29	34,6	112,0	26,55	0,988	0,034
	5,65	25,58	21,12	8,28	0,93					
	11,30	25,46	18,91	12,70	1,87					
	24,90	24,79	17,29	16,44	0,54					
	24,90	26,82	17,44	17,24	3,73					
Mittelwert		25,86	19,82	11,60 ±2,40	1,47 ±0,63					

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 1

4 kR	20,80	23,06	16,09	14,20	1,42	29,1	103,3	19,78	0,855	0,0323
	20,80	23,34	16,27	17,54	1,61					
	5,80	23,63	17,83	31,00	1,73					
	5,80	22,51	16,35	24,36	2,66					
	9,80	20,75	12,60	18,80	2,22					
	9,80	21,48	14,18	18,20	2,14					
Mittelwert		22,46	15,55	20,68 ±2,46	1,97 ±0,19					
7,7 kR	5,65	12,26	8,29	51,20	-1,38	21,95	105,0*	13,07	0,995	0,034
	5,65	11,55	8,11	52,00	-3,21					
	11,50	11,58	6,36	79,40	+4,14					
	11,50	12,32	6,08	87,60	+7,72					
	Mittelwert		11,93	7,20	67,55 ±9,34					

*: Werte gemessen mit dem Viskosimeter nach Aten

Tabelle 2: Vergleich der Daten bestrahlter DNA-Lösungen unter Stickstoff- und unter Sauerstoffatmosphäre (2. Serie)

Dosis	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	$M_w \cdot 10^{-6}$	$M_n \cdot 10^{-6}$	$A \cdot 10^6$ $Q \cdot 10^6$ Mittelwerte		$S_{20,w,0,5}^o$	$[\eta]$ [dl/g]	$M_{s\eta} \cdot 10^{-6}$	K_s	A_s
KONTROLLE	5,8 5,8 10,0 10,0	28,94 29,42 27,15 28,59	28,91 29,40 27,13 28,55			35,0	134,0	29,89	0,810	0,03228
Mittelwert		28,52	28,49							
1 [krad] N_2	5,96 5,96 14,10 14,10	31,60 28,11 25,34 25,19	27,87 25,36 20,21 20,86			35,2	102,0	26,22	0,728	0,03424
Mittelwert		27,56	23,57	5,05 $\pm 1,45$	1,055 $\pm 0,21$					
1 [krad] O_2	6,0 10,52 10,52 17,15 17,15	29,02 29,15 27,12 26,87 26,07	20,04 23,85 21,76 20,92 22,02			35,2	122,5	28,87	0,728	0,03346
Mittelwert		27,64	22,71	8,65 $\pm 1,14$	1,796 $\pm 0,41$					
2 [krad] N_2	6,0 6,0 10,62 10,62	22,93 23,89 23,78 23,56	16,38 18,06 15,57 17,48			35,7	92,0	25,39	1,066	0,03579
Mittelwert		23,54	16,87	16,86 $\pm 1,66$	1,96 $\pm 0,41$					

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 2

2 [krad] O ₂	12,8	26,29	13,71							
	12,8	29,00	13,92							
	16,0	24,45	14,12			31,85	98,0	22,08	1,169	0,03379
	16,0	26,86	16,05							
Mittelwert		26,65	14,45	27,28 ±2,55	6,28 ±0,72					
4 [krad] N ₂	5,13	25,67	14,82							
	5,13	17,78	11,98							
	15,80	16,14	7,54			25,0	70,0	12,99	1,064	0,03295
	15,80	19,37	8,28							
Mittelwert		19,74	10,66	47,28 ±11,2	6,52 ±2,13					
4 [krad] O ₂	5,80	15,79	10,42							
	5,80	15,26	10,40							
	11,00	14,92	10,19			26,3	68,0	13,82	0,69	0,03388
	11,00	16,12	10,45							
Mittelwert		15,52	10,36	38,52 ±0,25	1,062 ±0,23					

Tabelle 3: Charakterisierung der DNA unbestrahlter und bestrahlter T1-Phagen. Bruch- und Vernetzungsraten.

Dosis [krad]	$M_w \cdot 10^{-6}$ Mittelwert der Werte bei 2 bis 3 Konzentrationen	$M_n \cdot 10^{-6}$	$A \cdot 10^6$ Mittelwert aus allen Einzelwerten von mindestens 2 Versuchen	$Q \cdot 10^6$	$S_{20,w,0,5}^o$	$[\eta]$ [dl/g]	$M_s \eta \cdot 10^{-6}$	K_s	A_s
KONTROLLE	28,26	28,26			33,30	165,0	30,49	0,695	0,0310
"	28,53	28,49			35,00	134,0	29,89	0,810	0,0328
"	29,60	29,60			38,15	153,0	36,17	1,351	0,0331
"	28,76	28,76			35,10	146,0	31,22	1,051	0,0324
"	24,78	24,78			34,10	129,0	28,60	0,653	0,0328
50	33,03	32,87	0,90		38,75	151,6	38,85	1,475	0,0334
"	30,27	28,55	$\pm 0,59$		35,57	153,7	32,60	0,975	0,322
"	24,53	24,32			32,20	129,0	25,79	1,203	0,322
100	29,72	29,49	2,10		35,00	131,0	29,40	1,029	0,03231
"	29,72	27,41	$\pm 0,46$		36,15	142,0	34,22	0,957	0,03212
150	31,79	29,07	1,73		36,83	144,1	33,28	1,4037	0,03309
"	24,67	23,36	$\pm 0,75$		33,84	132,0	28,07	0,8750	0,03258
250	23,49	20,85	6,350	0,688	32,69	123,0	25,73	0,8518	0,03260
"	26,02	25,87	$\pm 1,88$	$\pm 0,51$	33,30	131,0	27,29	0,9836	0,03257
"	28,02	20,42			37,73	123,9	32,00	1,1430	0,03445

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 3

350	24,75	17,25	7,530	1,205	37,45	127,0	32,05	0,8644	0,03417
"	24,79	23,69	±1,42	±0,41	34,30	114,9	26,73	0,9517	0,03368
"	26,39	21,89			34,36	130,0	28,50	0,893	0,03288
500	23,15	16,68	14,850	0,818	28,94	98,0	18,68	0,778	0,03286
"	22,03	19,23	±1,46	±0,39	33,22	98,6	23,58	0,7993	0,03434
"	21,94	16,03			29,60	111,4	21,12	0,972	0,03201
750	21,67	12,46	28,82	1,880	26,39	82,0	15,23	0,8395	0,03254
"	16,96	14,71	±2,74	±1,28	32,19	86,0	21,03	0,5202	0,03484
"	17,97	11,41			26,80	81,5	15,60	0,6380	0,03259
1000	16,34	12,26	32,58	3,803	25,97	55,0	13,55	0,7184	0,03358
"	25,27	11,76	±3,56	±2,19	25,89	76,0	14,44	1,323	0,03262

Tabelle 4: Schmelzpunkt, Mol-Prozent CG, benötigter Temperaturintervall zur Denaturierung und zur Renaturierung sowie das Ausmaß der Renaturierung von DNA-Lösungen verschiedener Herkunft.

DNA	$T_m(^{\circ}\text{C})$	Mol % CG eigene Best.	Mol % CG andere Autoren	$\Delta T_{\text{Den}}(^{\circ}\text{C})$	$\Delta T_{\text{Ren}}(^{\circ}\text{C})$	$\Delta T_{\text{Ren}}/\Delta T_{\text{Den}}$	Ausmaß der Renaturierung in %
T1	89,5	48	48 Stent (1963)	6,5	19,5	3	88,3
T4	84,0	35	35 Marmur u. Doty (1962) 34,4 Sinsheimer (1960)	4	30	7,5	84,5
Kalbs- thymus	87,5	42,5	42 Marmur u. Doty (1962) 41,9 Chargaff (1955)	7,5	65,5	8,7	56,5

Tabelle 5: Schmelzpunkt, benötigter Temperaturintervall zur Denaturierung und zur Renaturierung sowie das Ausmaß der Renaturierung in Lösung bestrahlter T1-DNA.

Dosis (krad)	$T_m(^{\circ}C)$	$\Delta T_{Den} (^{\circ}C)$	$\Delta T_{Ren} (^{\circ}C)$	$\Delta T_{Ren} / \Delta T_{Den}$	Ausmaß der Renaturierung in %
KONTROLLE	89,5	6	17	2,8	89,6
1	89,25	6	16	2,7	87
2	89,15	6,7	19,3	2,9	86
4	87,7	10,2	21,3	2,1	80
7,7	86,2	16,2	28	1,7	75

Tabelle 6: Schmelzpunkt, benötigter Temperaturintervall zur Denaturierung und zur Renaturierung sowie das Ausmaß der Renaturierung von DNA bestrahlter Phagen.

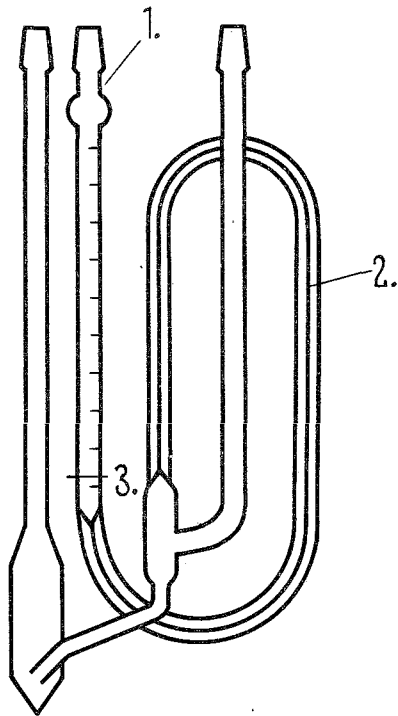
Dosis (krad)	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$\Delta T_{\text{Den}}(^{\circ}\text{C})$	$\Delta T_{\text{Ren}}(^{\circ}\text{C})$	$\Delta T_{\text{Ren}}/\Delta T_{\text{Den}}$	Ausmaß der Renaturierung in %
KONTROLLE	89,5	6,0	26,5	4,42	73,3
500	89,2	7,2	29,0	4,03	72,0
750	88,7	16,2	36,7	2,26	62,6

Tabelle 7: G-Werte für biologische Inaktivierung, Doppelbrüche und Vernetzungen der DNA

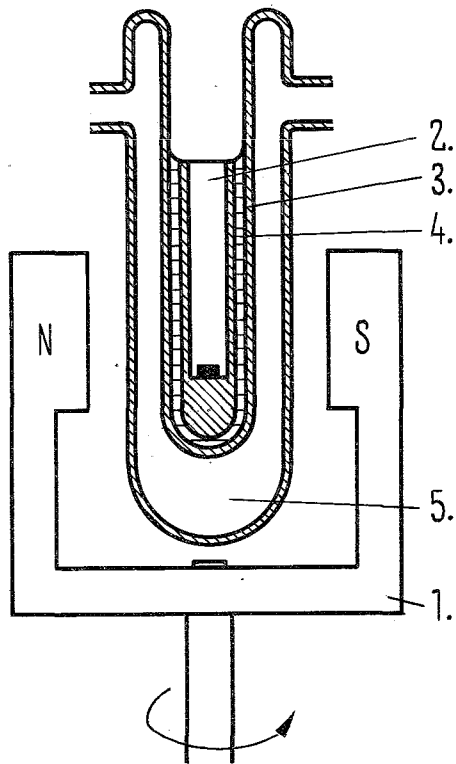
Bestrahlungsbedingungen	Ereignis	G-Wert	Energiebedarf (ev)	Autor
DNA im Phagen (10^{-3} m Histidin)	biologische Inaktivierung der DNA	0,324	310	Freifelder (1965)
DNA im Phagen (5 x NB oder 10^{-1} m Histidin)	"	0,344	290	unsere Ergebnisse Hctz u. Zimmer (1963) (mit $m = 0,5 \cdot 10^{-16}$ g)
DNA im Phagen (10^{-3} m Histidin)	Doppelbruch	0,130	770	Freifelder (1965)
DNA im Phagen (10^{-1} m Histidin)	Doppelbruch, Vernetzungen	0,095	1050	unsere Ergebnisse: Gradientenauswertung
"	Doppelbruch	0,039	2560	aus b (linearer Anteil)
"	Vernetzungen	0,008	12700	aus q
"	Doppelbruch, Vernetzungen	0,072	1390	mit D_e
Trockene DNA	Doppelbruch	0,125	800	Lett, Stacey u. Alexander (1961)
DNA-Gel	"	0,160	600	Lett u. Alexander (1961)
Trockene DNA im Vakuum	"	0,110	909	Hagen u. Wellstein (1965)
DNA im Nukleoprotein-Gel	"	0,022	4550	Weinert u. Hagen (1967)
"	"	0,031	3230	" " ("

Abb. 1a: Viskosimeter nach Ubbelohde, modifiziert nach Aten (1965): 1. Zylindrisches Rohr mit Millimeterinteilung. 2. Kapillare. 3. Gleichgewichtsstand h_0

1b: Rotationsviskosimeter nach Zimm und Crothers (1962): 1. rotierendes Magnetfeld. 2. Rotor. 3. Stator. 4. DNA-Lösung. 5. thermostatisierbares Mantelgefäß.



a) Viskosimeter nach UBBELOHDE



b) Rotationsviskosimeter

Abb. 2: Beziehung zwischen der spezifischen Viskosität η_{sp} und der Höhe h der Flüssigkeitssäule in Kapillarviskosimeter (siehe Abb. 1a) zur Ermittlung der spezifischen Viskosität von T4-DNA bei der Scherkraft $\langle \bar{s} \rangle = 0$. Die extrapolierten Werte für η_{sp} sind zur Bestimmung der Grenzviskosität nochmals gegen die Konzentration c aufgetragen.

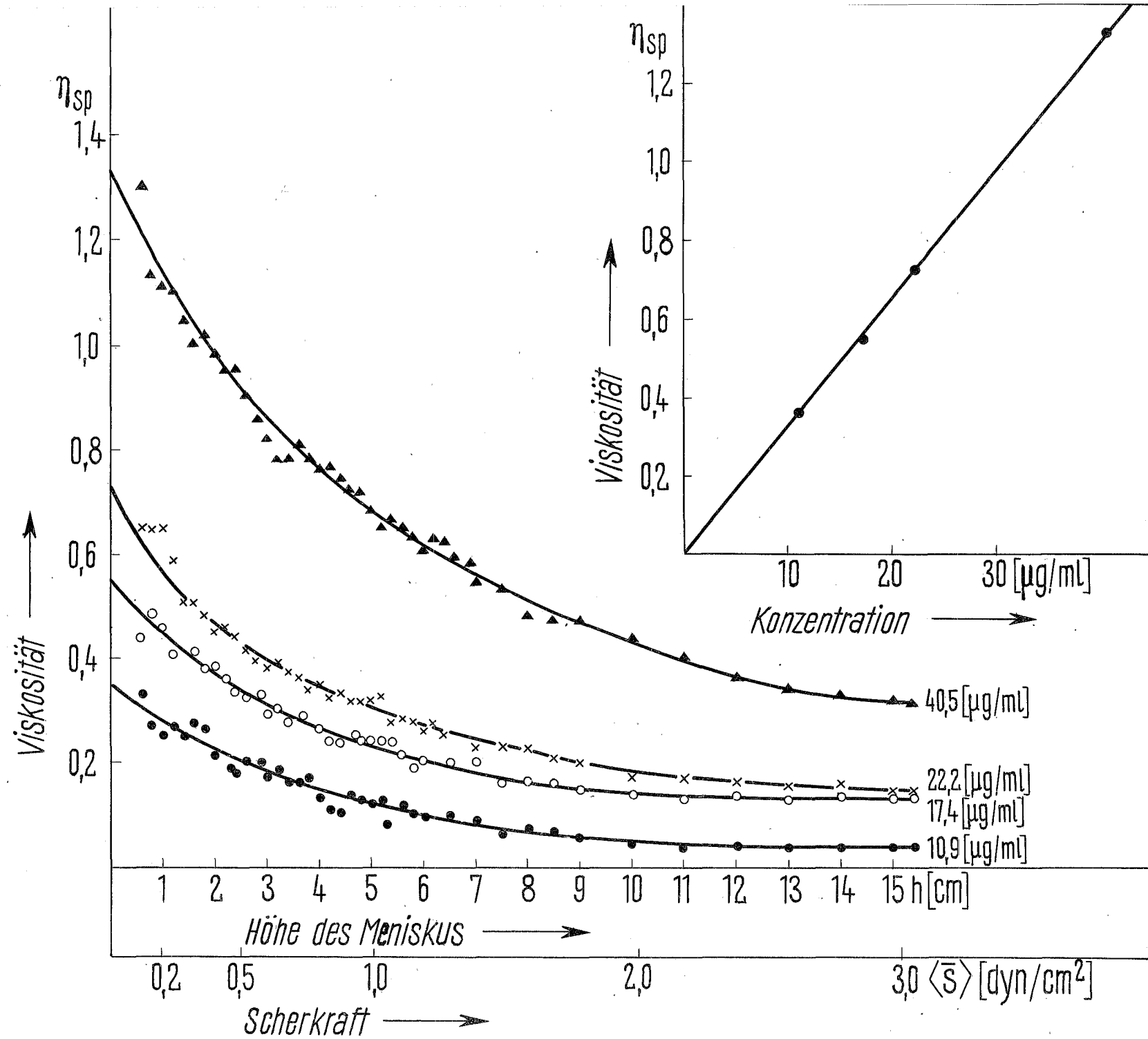


Abb. 3a: Extrapolation von $1/S_{app, 0,5}$ gegen die Konzentration $c = 0$ für eine unbestrahlte T1-DNA (o) und für eine mit 1 krad bestrahlte Probe (o)

3b: Auftragung der spezifischen Viskosität η_{sp} gegen die Konzentration c für unbestrahlte T1-DNA. Messung im Rotationsviskosimeter.

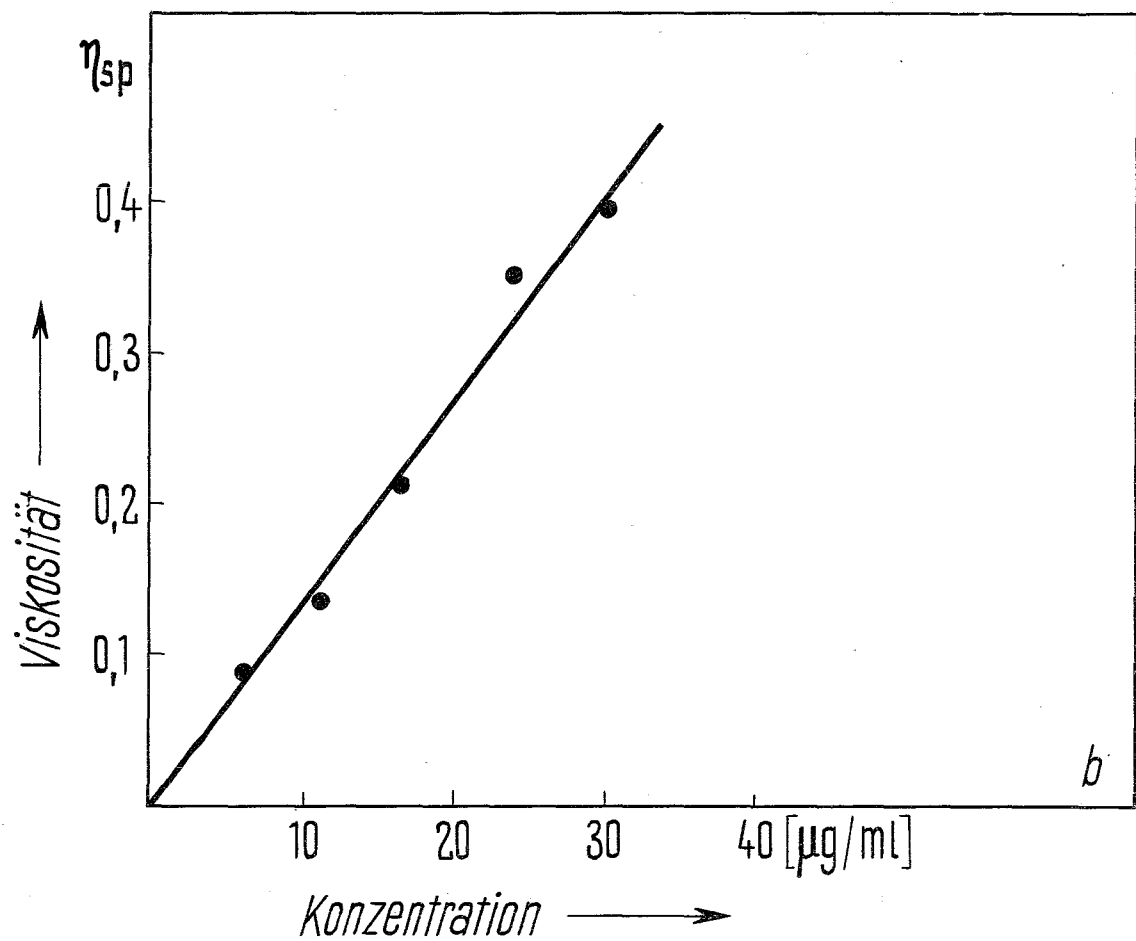
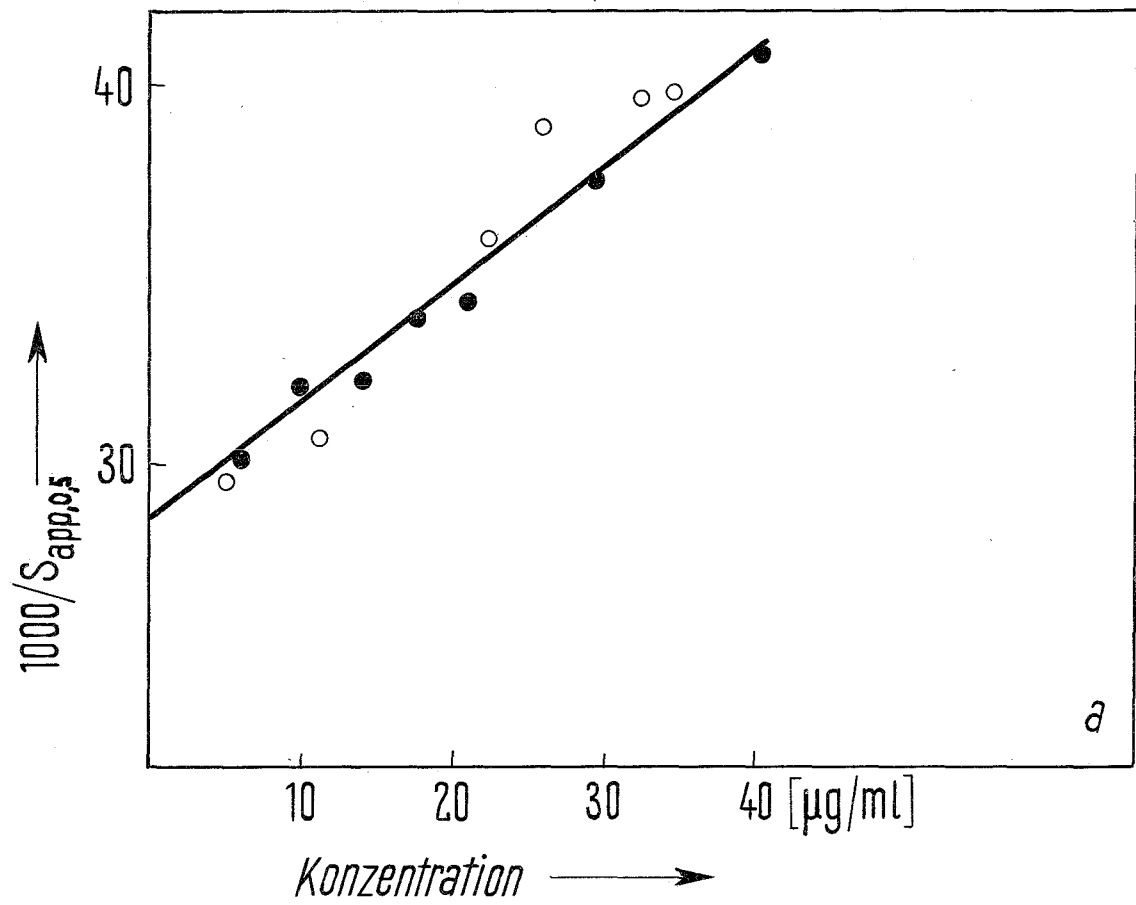


Abb. 4a: Gradient einer UV-Aufnahme während der Sedimentation einer unbestrahlten DNA.

4b: Gradient einer UV-Aufnahme während der Sedimentation einer bestrahlten DNA. Die Pfeile kennzeichnen die Abschnitte, welche die langsamer oder schneller als die unbestrahlte Kontrolle sedimentierenden Moleküle repräsentieren.

RL: Referenzlinie M: Meniskus

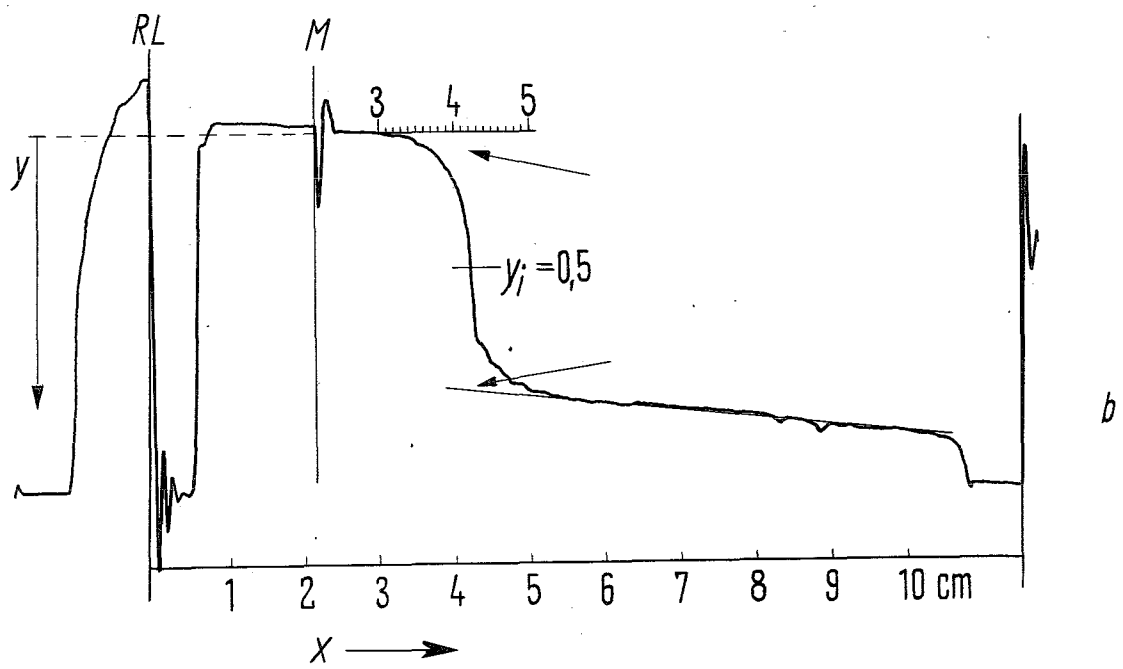
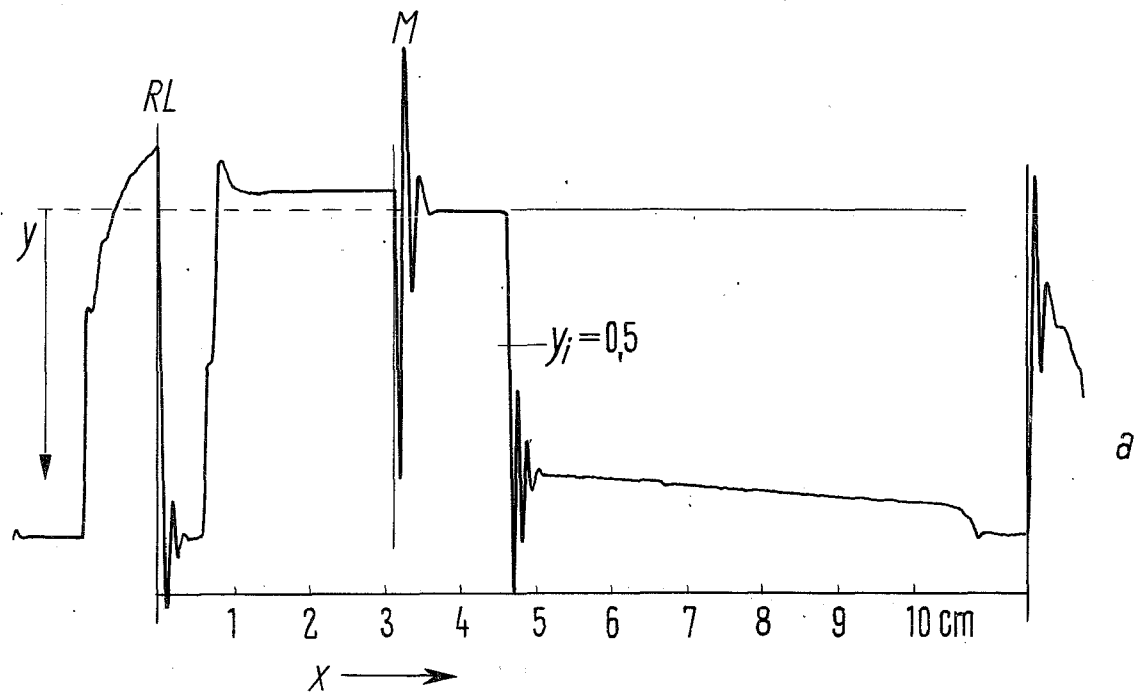


Abb. 5: Verteilung der $S_{app,i}$ -Werte bestrahlter T1-DNA (4 krad), ermittelt aus Sedimentationen bei verschiedener Konzentration:

o ———— o 20,8 $\mu\text{g/ml}$

Δ — · — · — Δ 9,8 $\mu\text{g/ml}$

\square - - - - - \square 5,8 $\mu\text{g/ml}$

o ————— o S_i^0 -Verteilung, erhalten aus der Extrapolation von $1/S_{app,i}$ gegen $c = 0$.

o, Δ , \square S_i^0 -Werte, ermittelt aus den experimentellen Punkten o, Δ , \square , welche nach den Gleichungen (3.5) und (3.6) gegen $c = 0$ extrapoliert wurden.

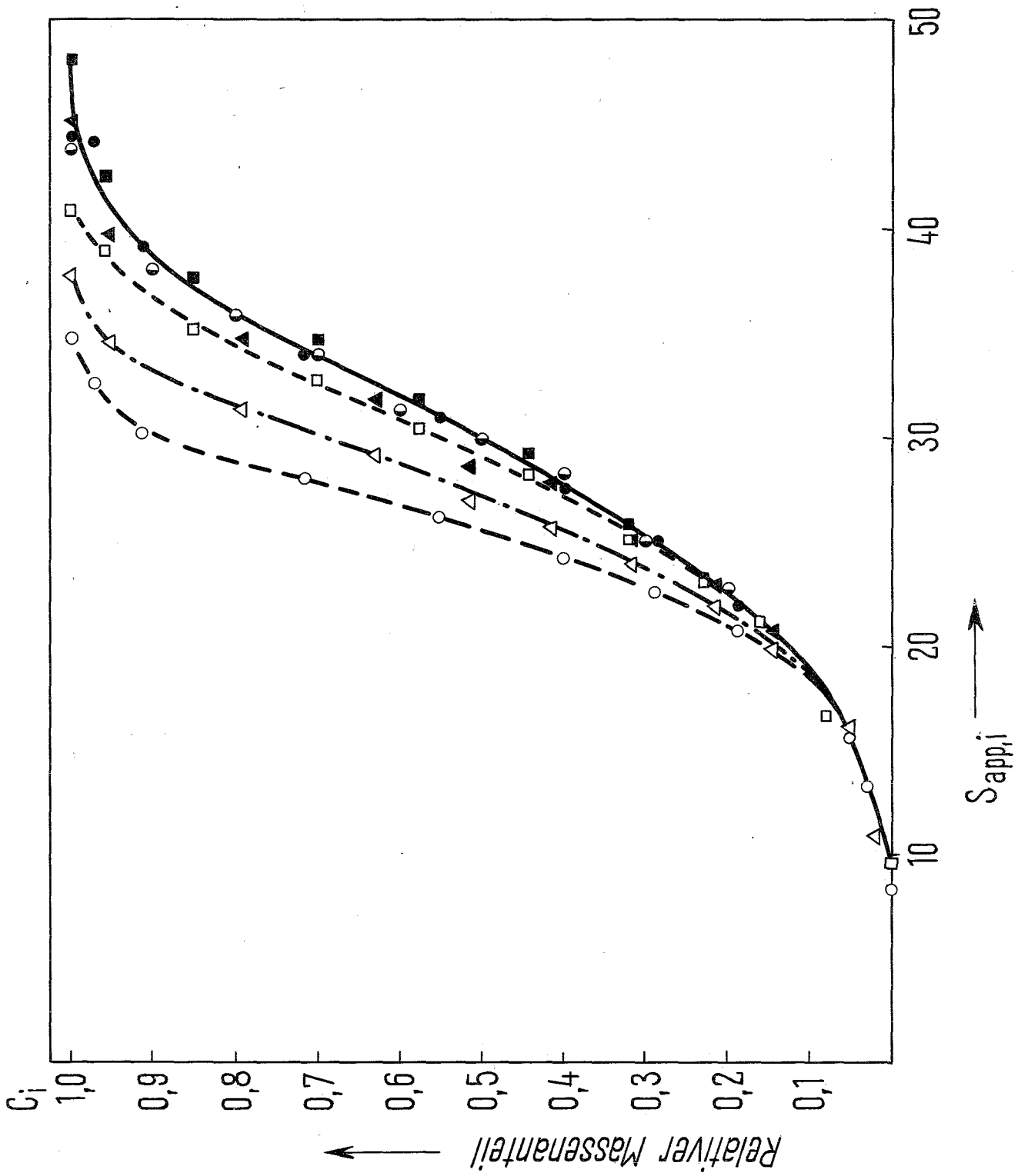


Abb. 6: Beziehung zwischen $S_{20,w}^0$ und dem Molekulargewicht $M_{s\eta}$. Die ausgezogene Kurve ist die Mittelwertskurve nach Eigner und Doty (1965). Die Symbole kennzeichnen die von uns gemessenen Werte:

- ∇ T4-DNA unbestrahlt
- o T1-DNA unbestrahlt
- o T1-DNA bestrahlt (in vivo)
- x T1-DNA bestrahlt (in vitro)

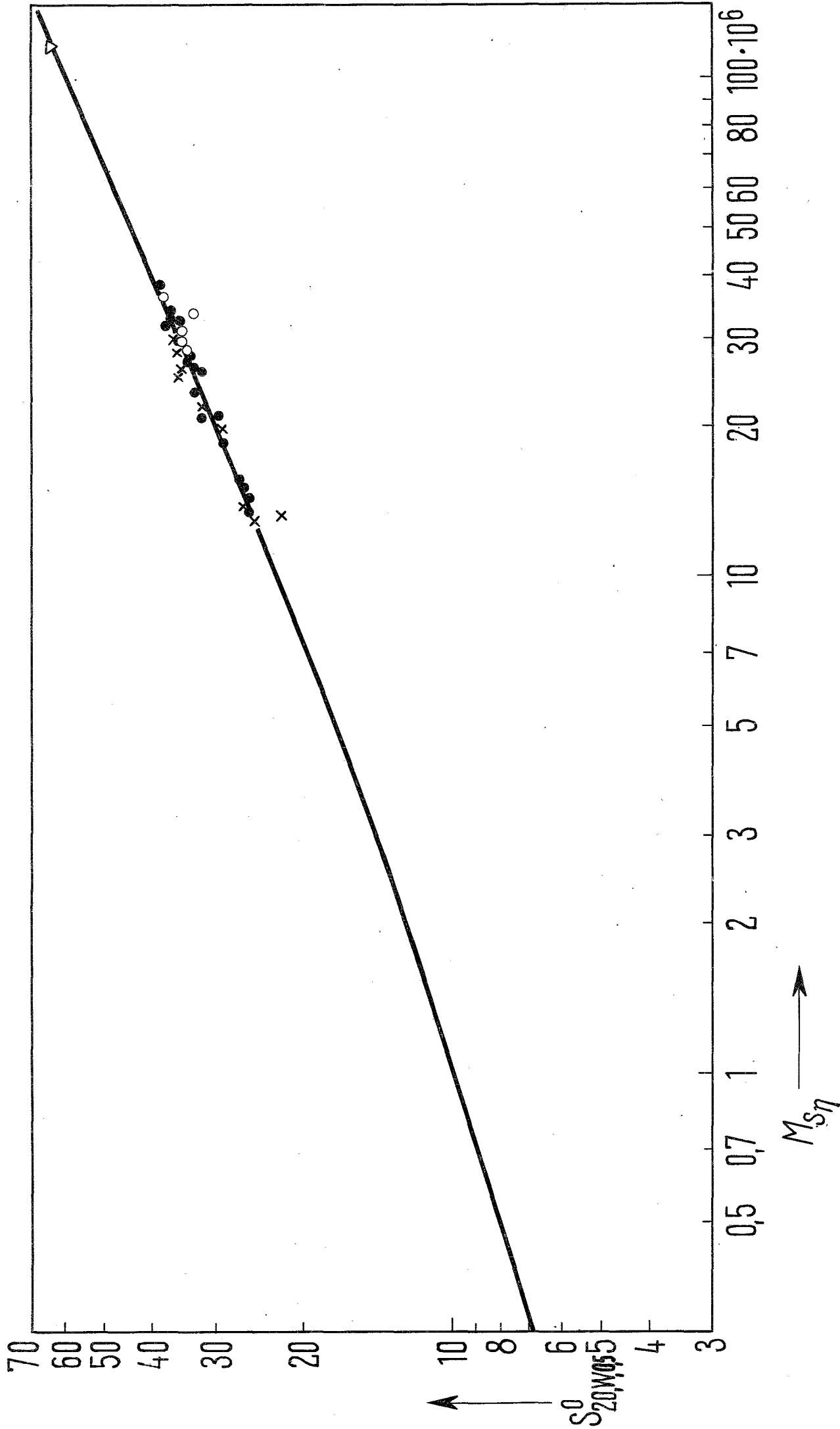


Abb. 7: Molekulargewichtsverteilung von T1-DNA, erhalten aus der Sedimentation bei verschiedenen Konzentrationen:

Kurve A: nicht bestrahlte DNA

Kurve B: bestrahlte DNA (1 krad bei 200 $\mu\text{g/ml}$ in N_2). \times, Δ : 20,8 $\mu\text{g/ml}$; \circ, \bullet : 9,8 $\mu\text{g/ml}$;

Kurve C: bestrahlte DNA (4 krad bei 200 $\mu\text{g/ml}$ in N_2). \times, Δ : 19,6 $\mu\text{g/ml}$; \circ, \bullet : 11,4 $\mu\text{g/ml}$; \square, \blacksquare : 6,3 $\mu\text{g/ml}$

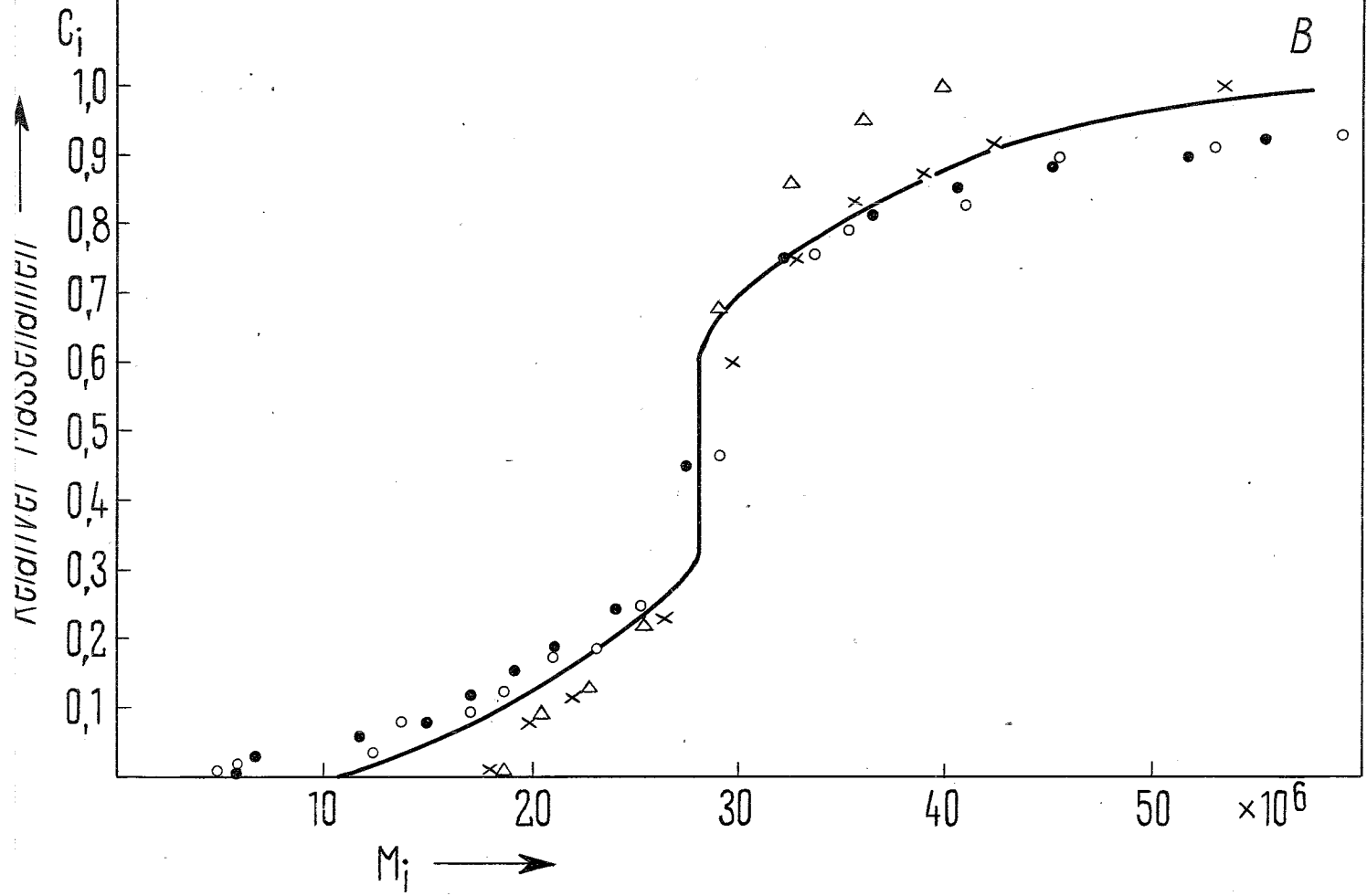
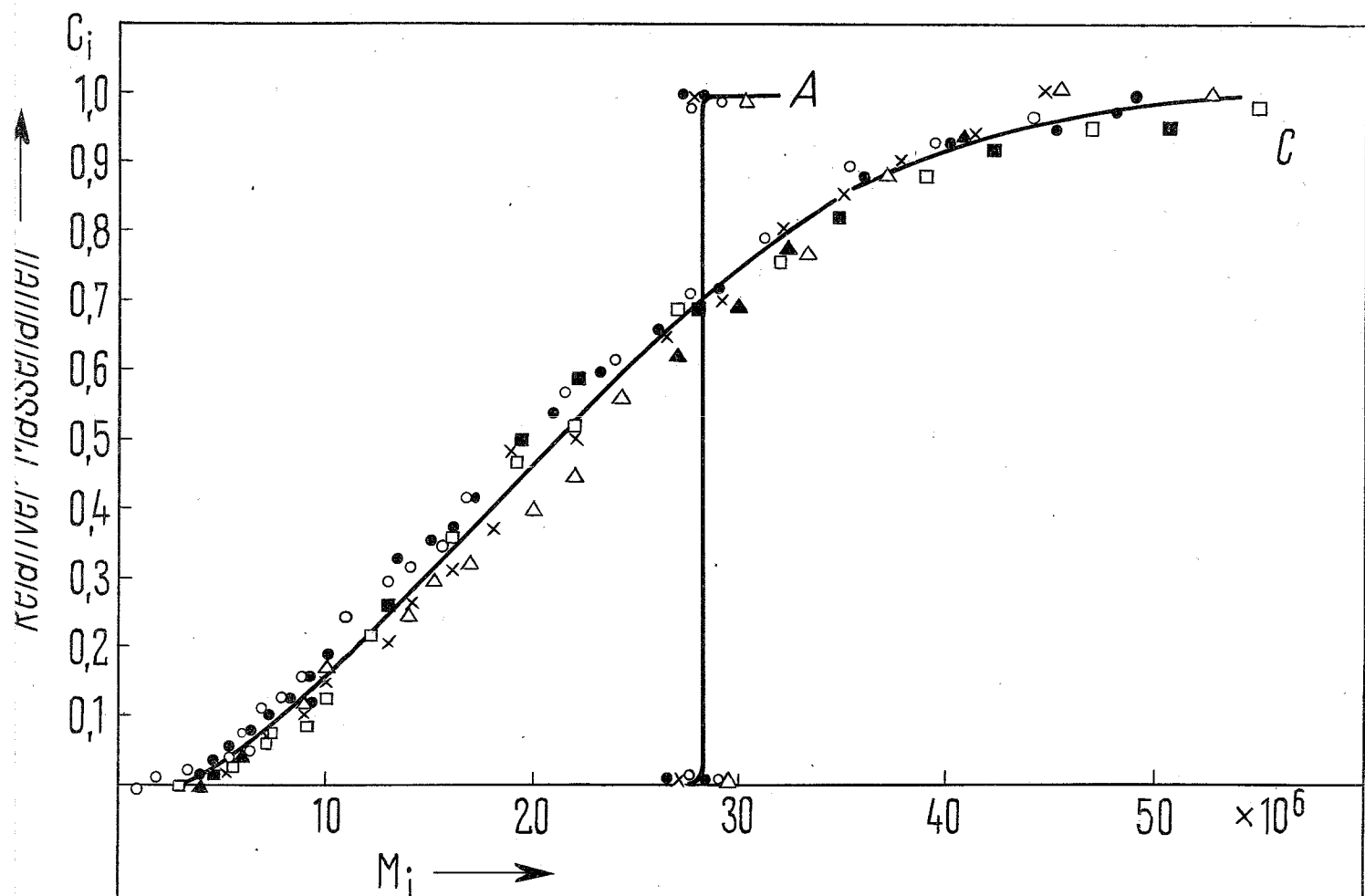


Abb. 8: Molekulargewichtsverteilung unbestrahlter und bestrahlter T1-DNA (Mittelwertskurven)

—————	unbestrahlte Kontrolle
—•—•—	1 krad
-----	2 krad
--x--x--x-	4 krad
-----	7,7 krad

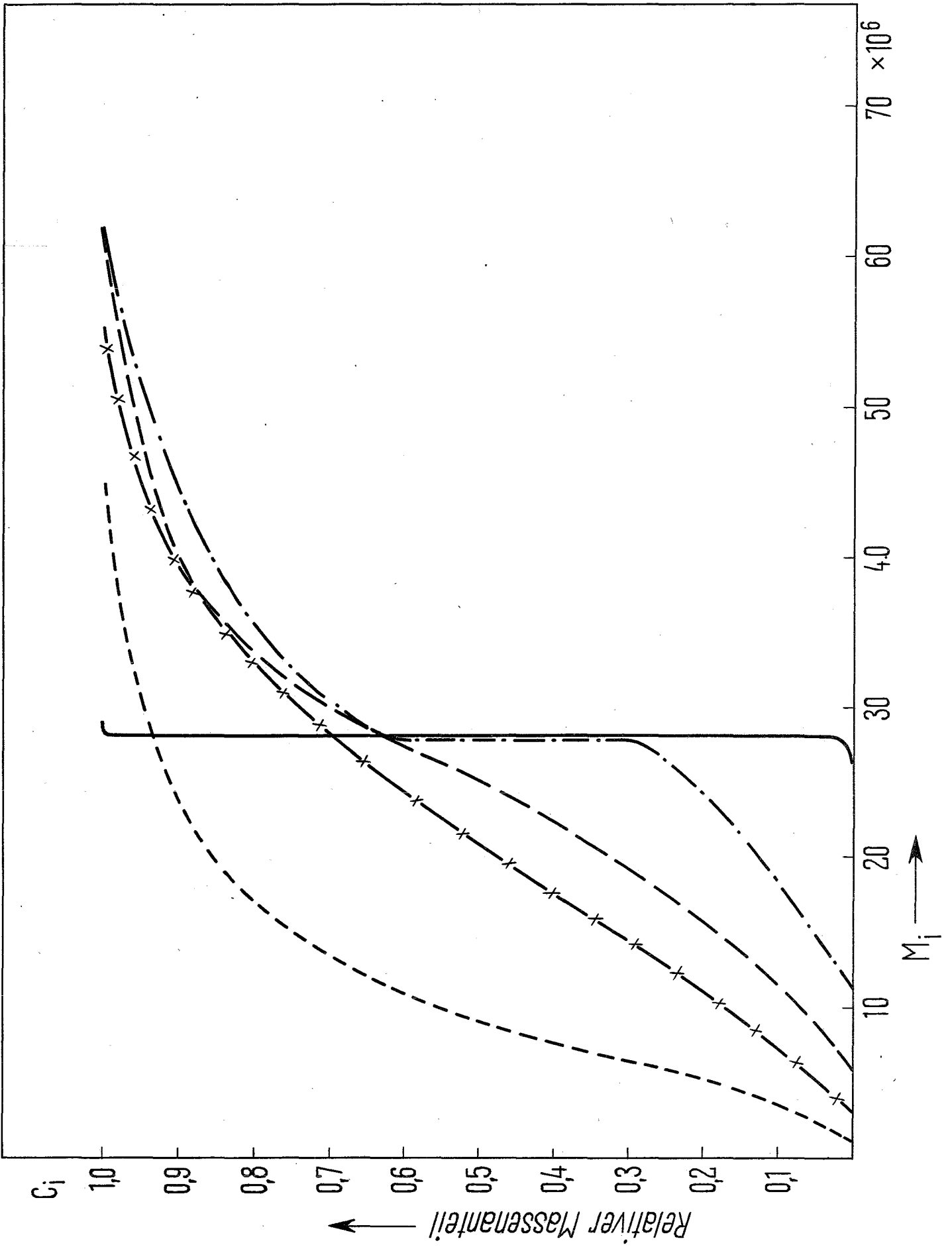


Abb. 9: Beziehung zwischen Bruchwahrscheinlichkeit A und Strahlendosis bei zwei Versuchsserien mit zwei verschiedenen DNA-Präparationen.

1. Serie: 200 µg/ml bestrahlt in N₂ (○)
2. Serie: 200 µg/ml bestrahlt in N₂ (□)
200 µg/ml bestrahlt in O₂ (▲)

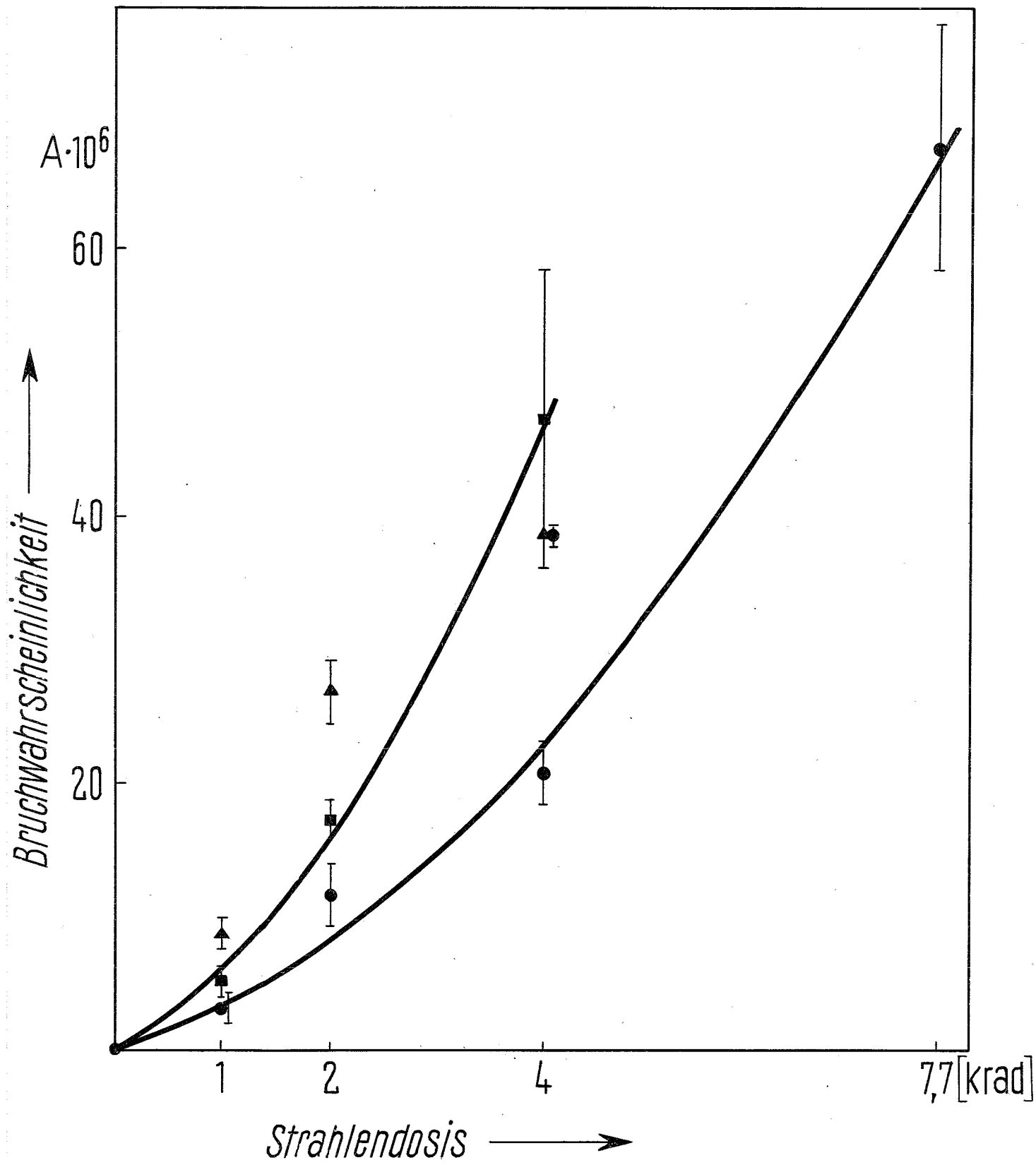


Abb. 10: Beziehung zwischen Vernetzungsrate Q und Strahlendosis

1. Serie: 200 $\mu\text{g/ml}$ bestrahlt in N_2 (○)
2. Serie: 200 $\mu\text{g/ml}$ bestrahlt in N_2 (□)
200 $\mu\text{g/ml}$ bestrahlt in O_2 (△)

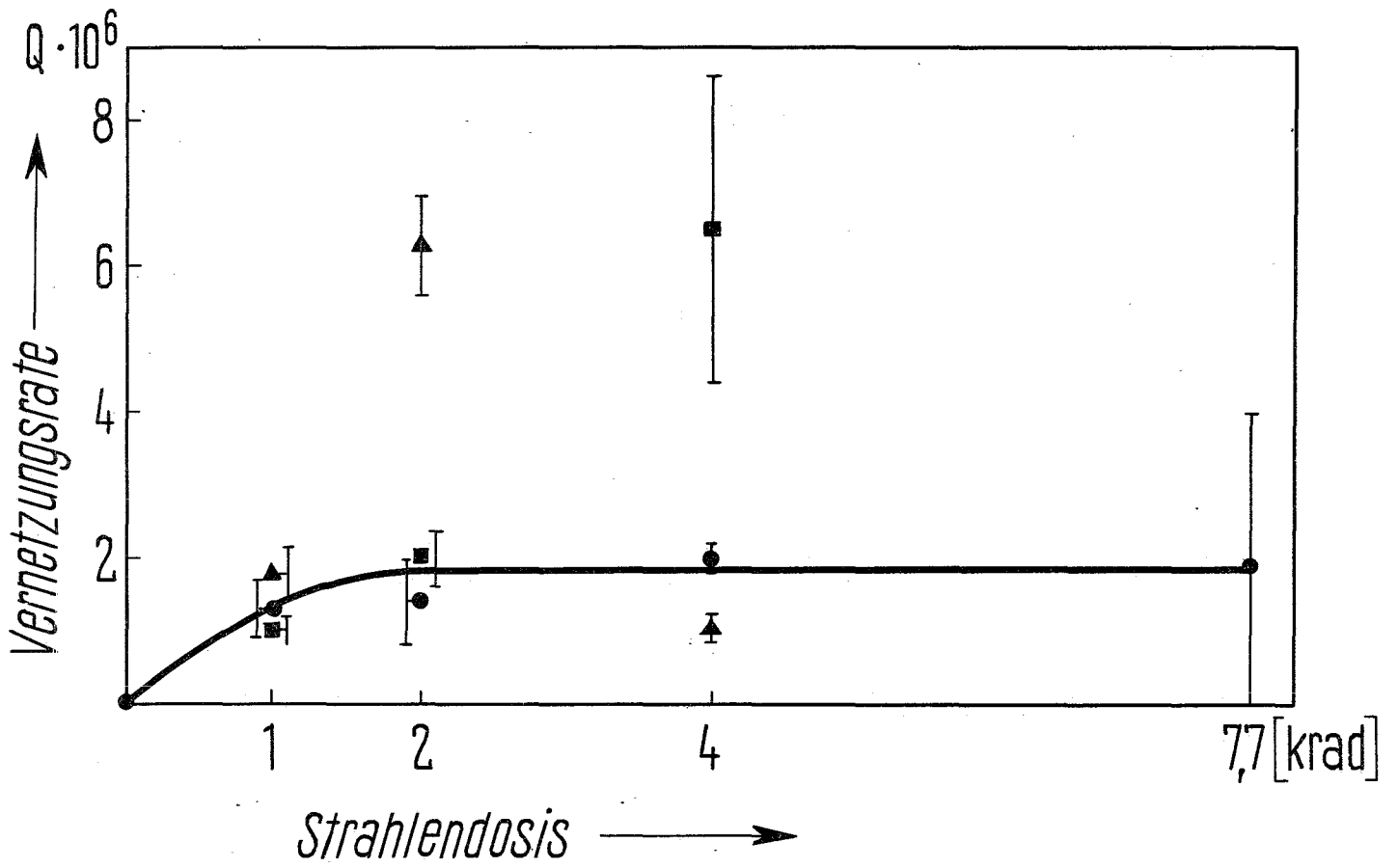


Abb. 11: Dosiseffektkurve für T1-Phagen

- o Bestrahlung in 5 x NB
- Bestrahlung in 0,1 m Histidinlösung + 0,165 m NaCl pH 7

Jeder Punkt ist der Mittelwert aus drei Versuchsserien.

Suspensionsmedium 5 x NB enthält auf 1 g H_2O : 10^{-6} g T1-Phagen und 0,05 g NB

Suspensionsmedium 0,1 m Histidinlösung enthält auf 1 g 0,165 m NaCl-Lösung: 10^{-6} g T1-Phagen und 0,155 g Histidin.

Strahlendosis →

150 300 450 600 750 900 [krad]

$\log \frac{N}{N_0}$

↑
Bruchteil der aktiven Phagen

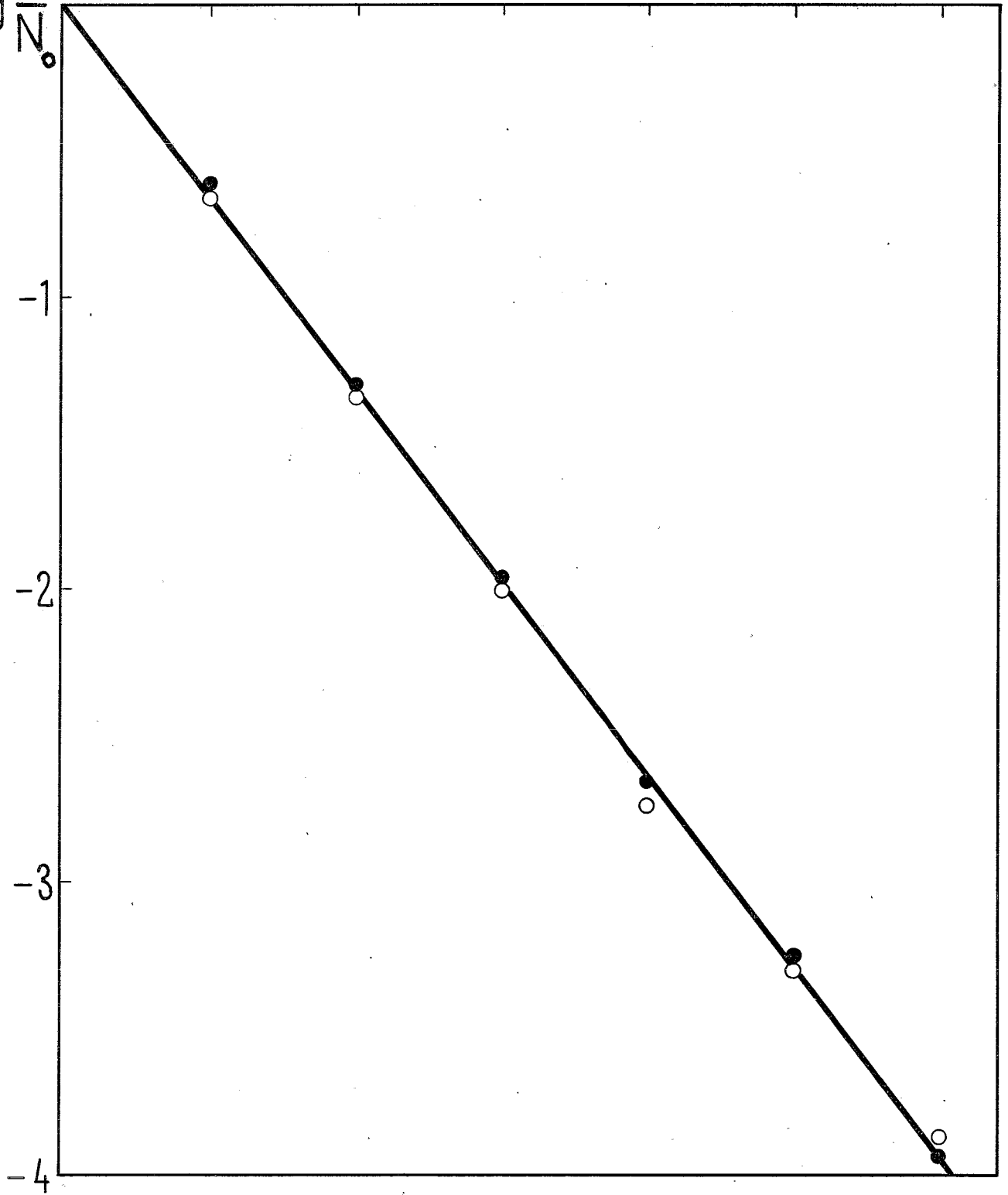


Abb. 12a: Gradient einer UV-Aufnahme während der Sedimentation von DNA bestrahlter Phagen (50 krad). Der Pfeil kennzeichnet den Anteil gebrochener, langsamer sedimentierender DNA-Moleküle.

12b: Gradient einer UV-Aufnahme während der Sedimentation von DNA bestrahlter Phagen (150 krad). Der untere Pfeil kennzeichnet den Anteil schneller sedimentierender Moleküle. RL: Referenzlinie, M: Meniskus

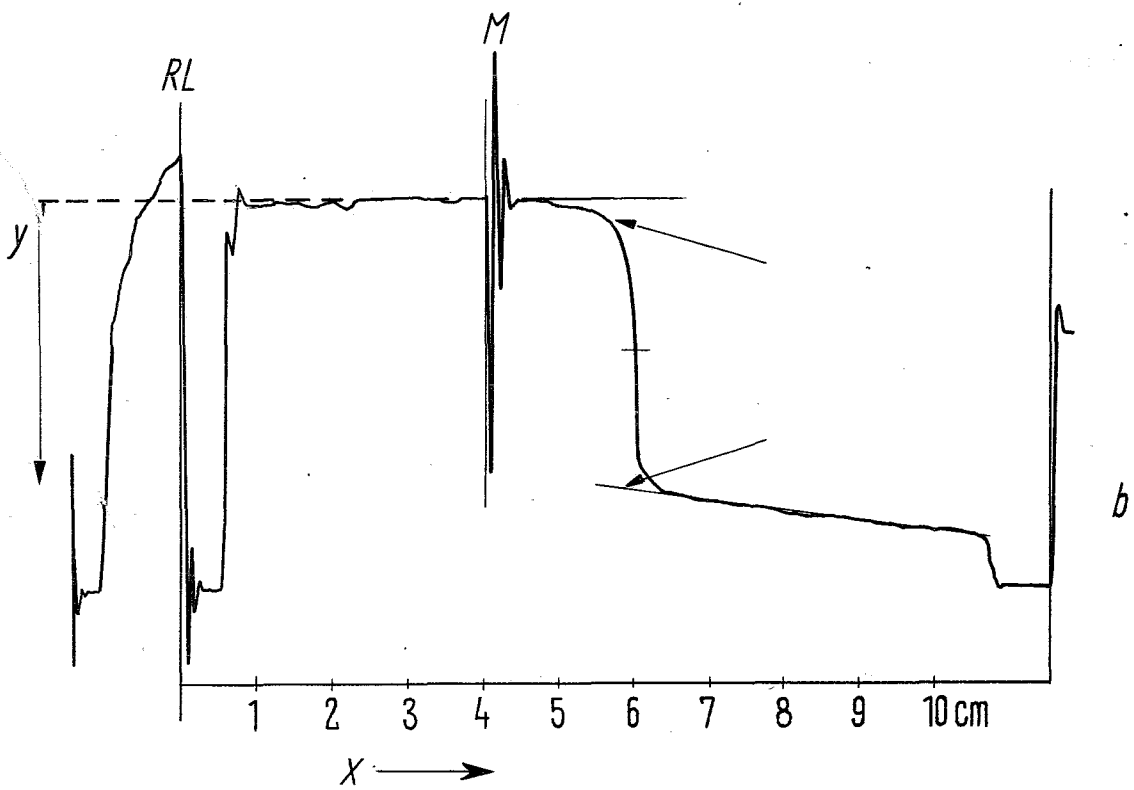
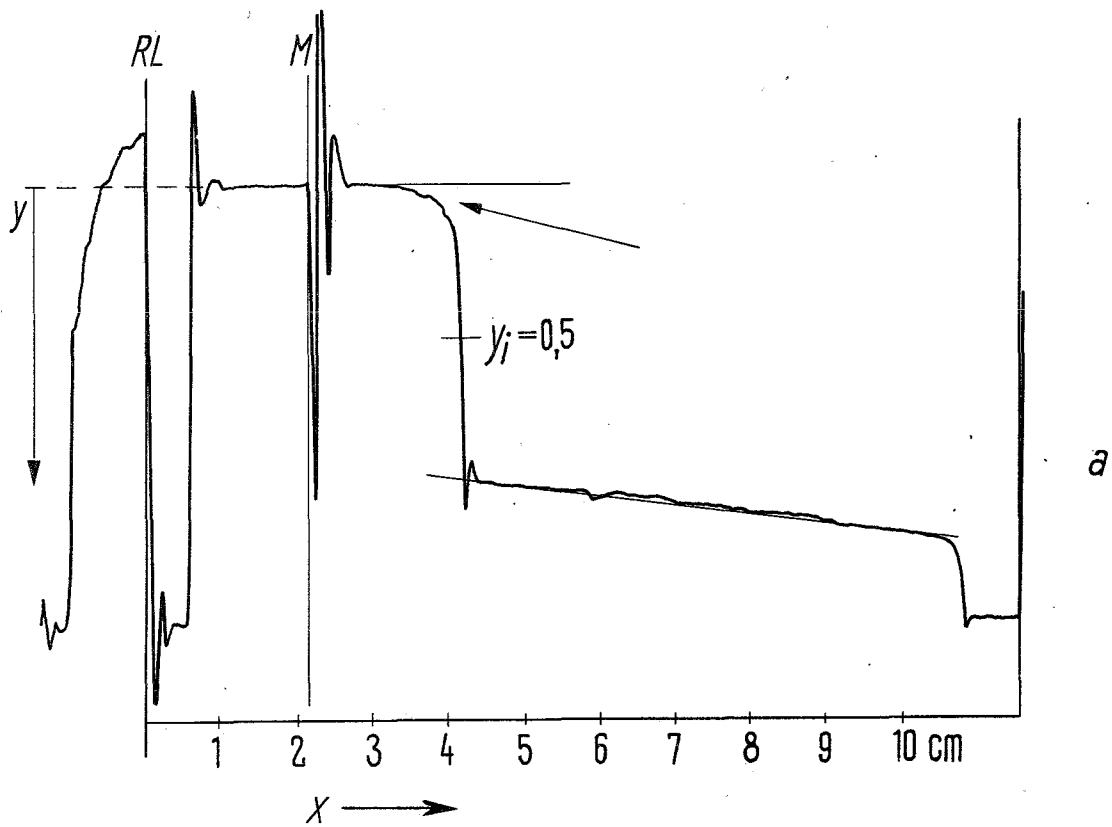


Abb. 13: Beziehung zwischen nicht geschädigten DNA-Molekülen und überlebenden Phagen in Prozent (geschlossene Symbole). Die offenen Symbole geben den Anteil der schneller als die noch ungeschädigten Moleküle sedimentierenden DNA-Fraktion an (vernetzte Moleküle). Die gestrichelte Linie gibt die Anfangsneigung der Kurve wieder.

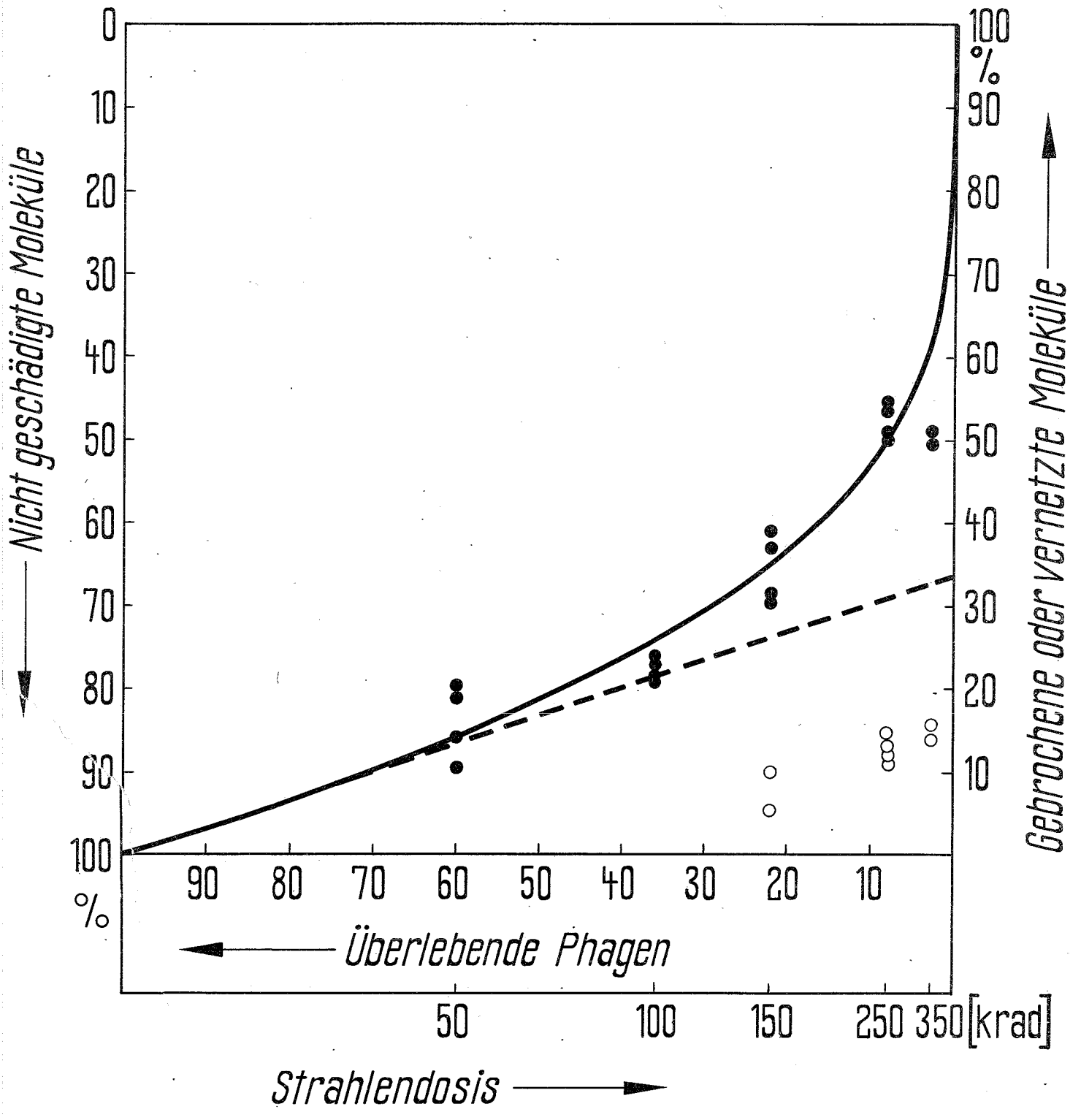


Abb. 14: Beziehung zwischen der Sedimentationskonstanten $S_{20,w}^0, 0,5$ und der Grenzviskosität $[\eta]$ von DNA bestrahlter Phagen.

o Kontrollen, o 50 krad, Δ 100 krad, \triangle 150 krad,
 \square 250 krad, \square 350 krad, x 500 krad, + 750 krad,
x 1000 krad.

Die ausgezogene Kurve entspricht der von Eigner und Doty (1965). Die gestrichelte Linie wurde durch einige abweichende Meßergebnisse gelegt.

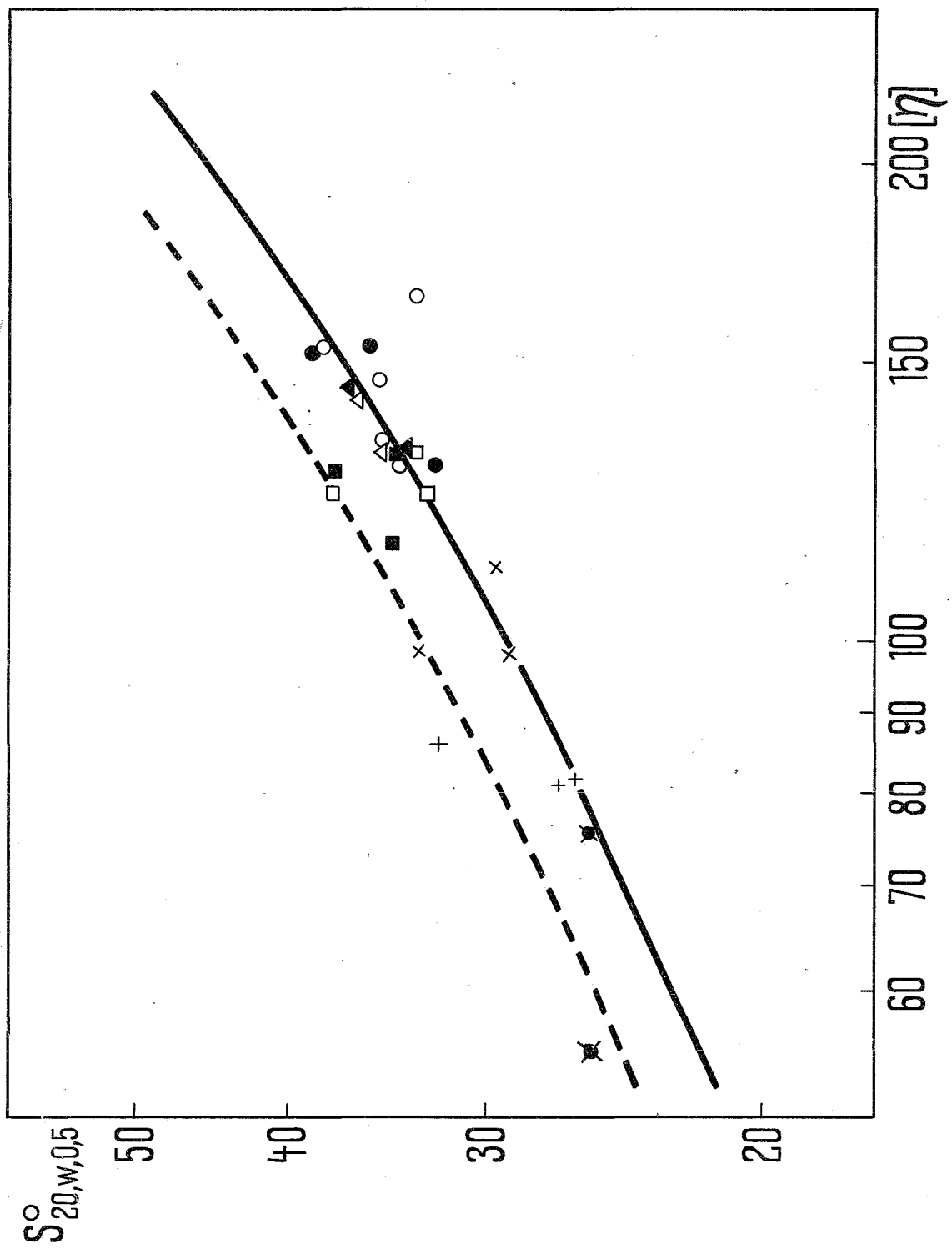


Abb. 15: Sedimentationsverteilung unbestrahlter DNA und von DNA bestrahlter Phagen.

Im schraffierten Teil liegen die Gradienten von fünf Kontrollen.

oooooo 50 krad, $\Delta\Delta\Delta\Delta$ 100 krad, ---- 150 krad,
- - - - 250 krad, -x-x- 350 krad, ----- 500
krad, 750 krad, xxxxxx 1000 krad.

Jede Kurve ist die Mittelwertslinie aus mindestens zwei unabhängigen Bestrahlungsversuchen.

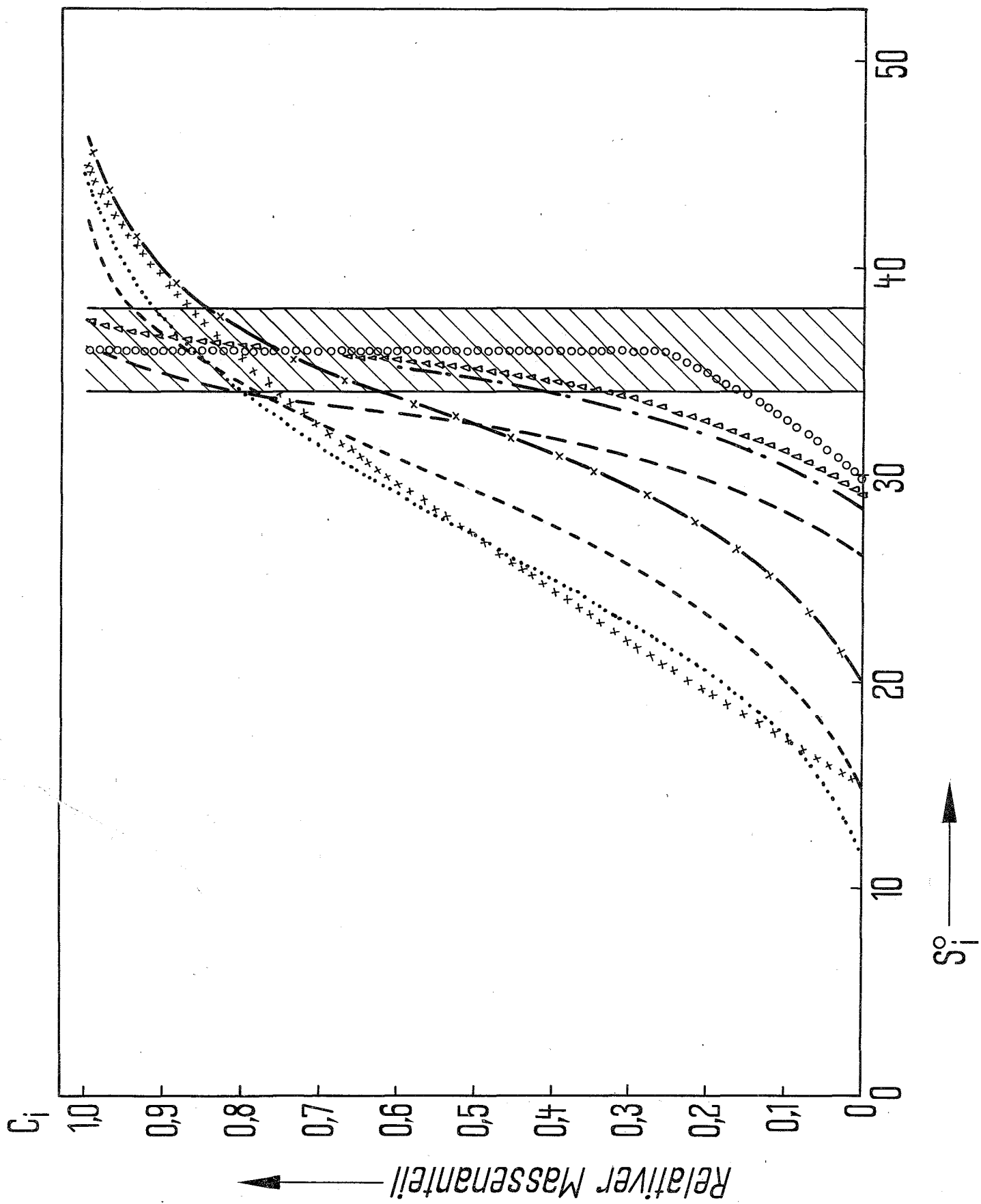


Abb. 16: Sedimentationsverteilung unbestrahlter DNA und von einigen DNA-Präparationen bestrahlter Phagen, deren $S_{20,w}^0$, $0,5^-$ und $[\eta]$ -Werte nicht der von Eigner und Doty angegebenen Beziehung $[\eta] = a(S^0)^b$ in Abbildung 14 (ausgezogene Linie) folgten.

--- 250 krad, -x-x- 350 krad, ----- 500 krad, 750 krad, xxxxxx 1000 krad.

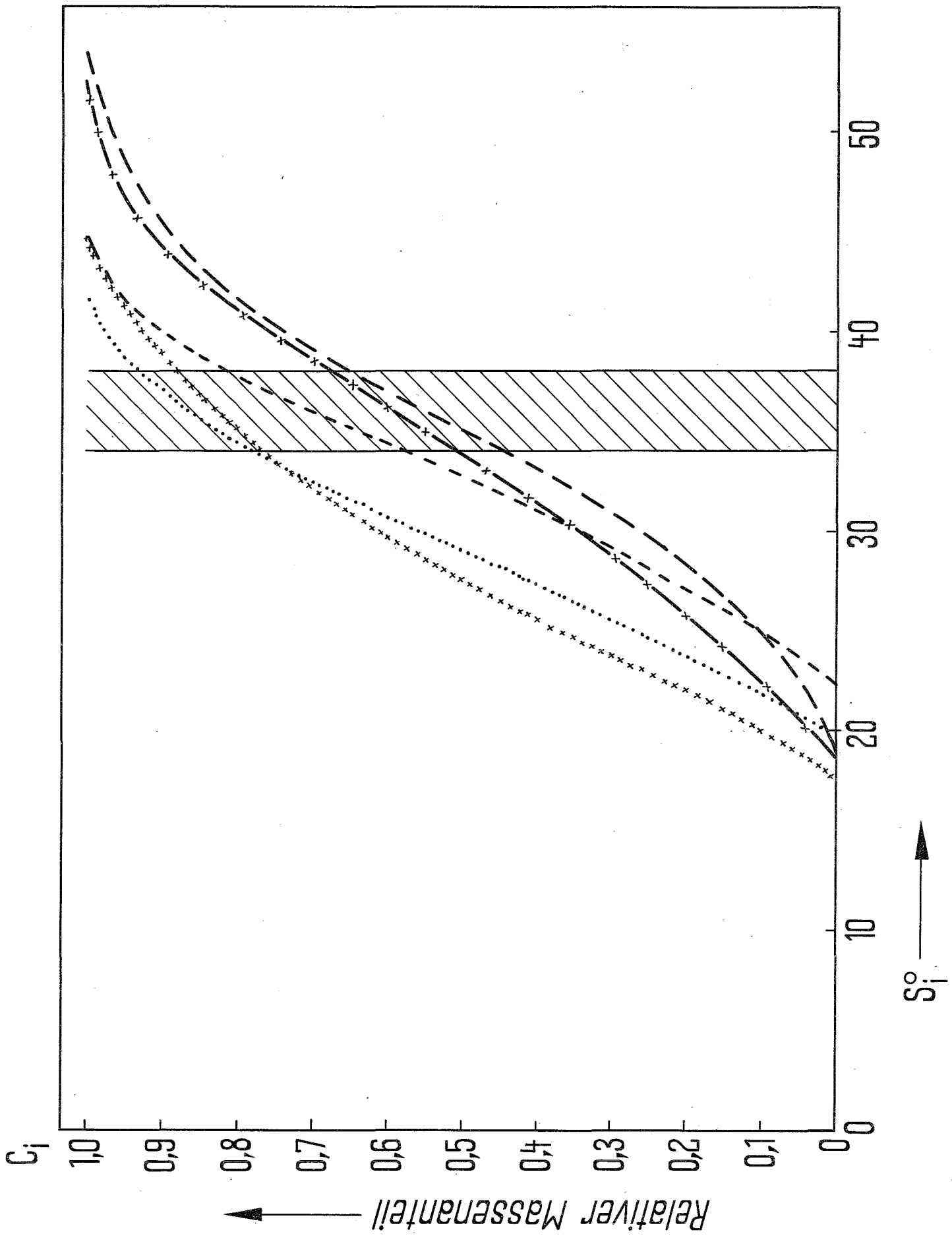


Abb. 17: Molekulargewichtsverteilung von DNA bestrahlter Phagen.

oooooo 50 krad, $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$ 100 krad, - - - - 250 krad,
-x-x- 350 krad, ----- 500 krad, 750
krad, xxxxxx 1000 krad.

Jede Kurve ist die Mittelwertskurve aus mindestens zwei unabhängigen Bestrahlungsversuchen.

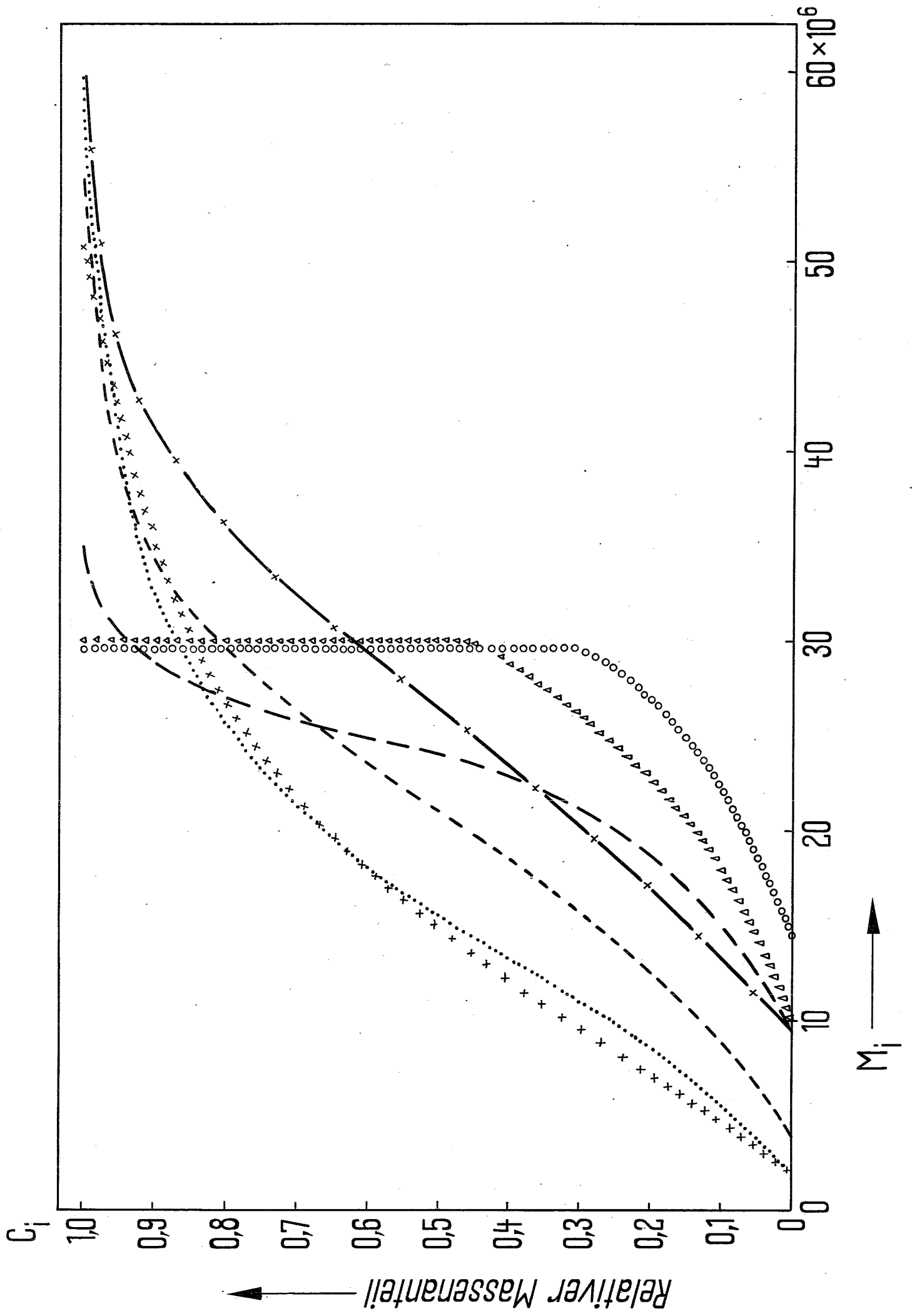


Abb. 18: Beziehung zwischen Bruchwahrscheinlichkeit A und Strahlendosis von DNA bestrahlter Phagen. Die ausgezogene Kurve wurde durch Regressionsanalyse ermittelt.

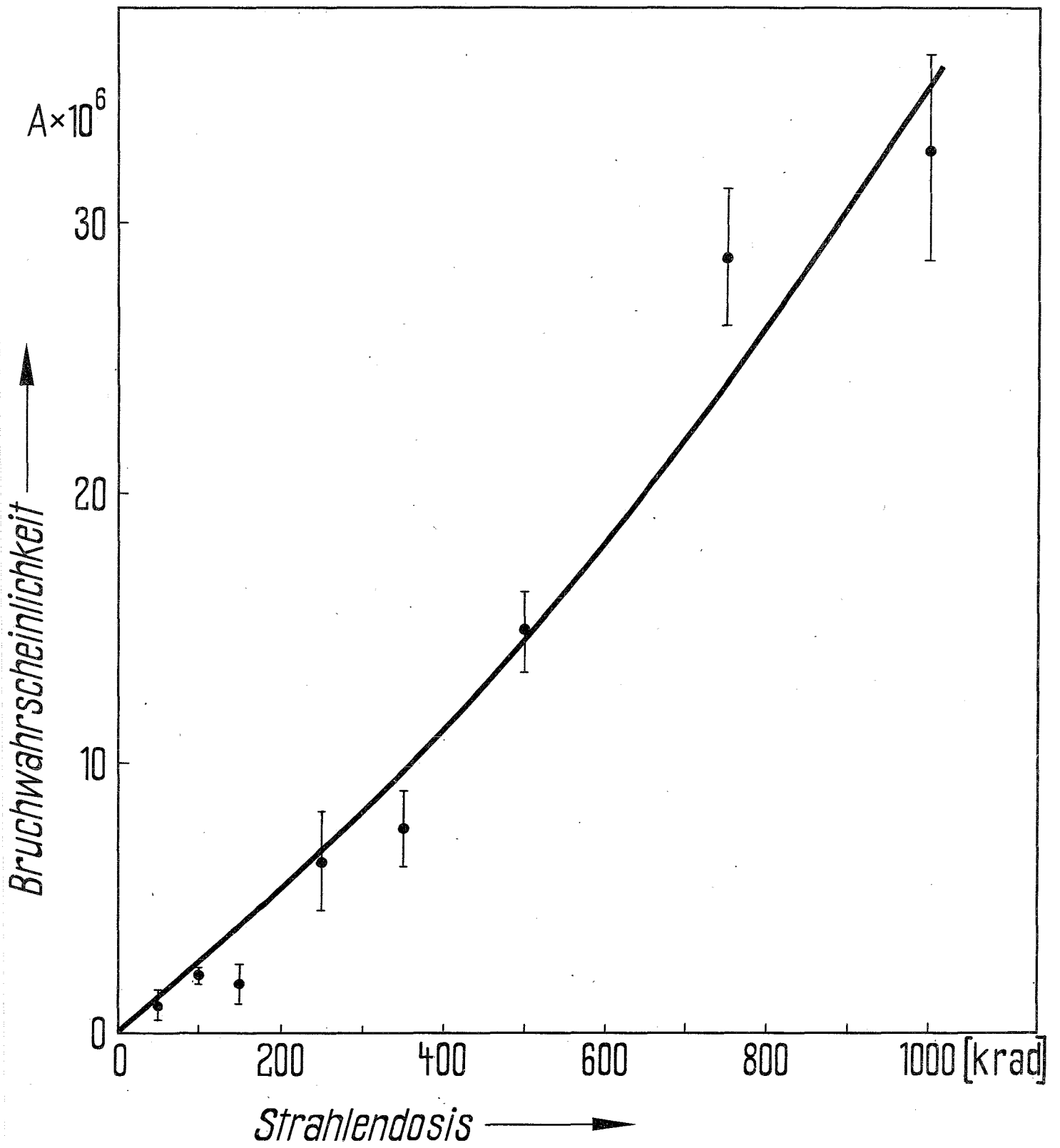


Abb. 19: Beziehung zwischen Vernetzungsrate Q und
Strahlendosis von DNA bestrahlter Phagen.

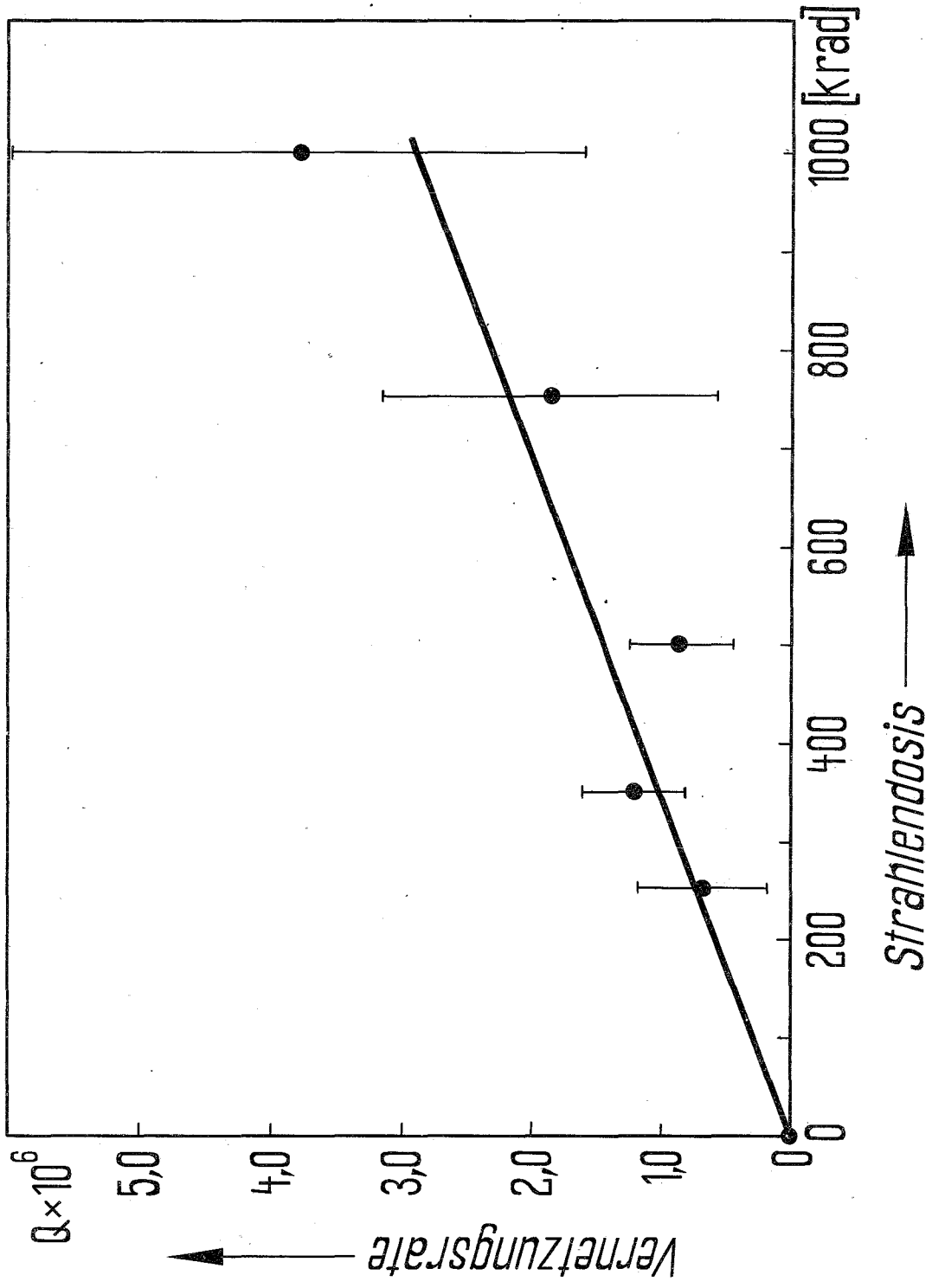


Abb. 20: Schmelzprofile (↑) und Renaturierungskurven (↓)
von DNA verschiedener Herkunft.

———— T1-DNA, - . - . - . - T4-DNA, ----- Kalbs-
thymus-DNA. Die Querstriche auf den Schmelzkurven
deuten die Schmelzpunkte an, bei den Querstrichen
auf den Renaturierungskurven ist die Extinktion
des Schmelzpunktes wieder erreicht.

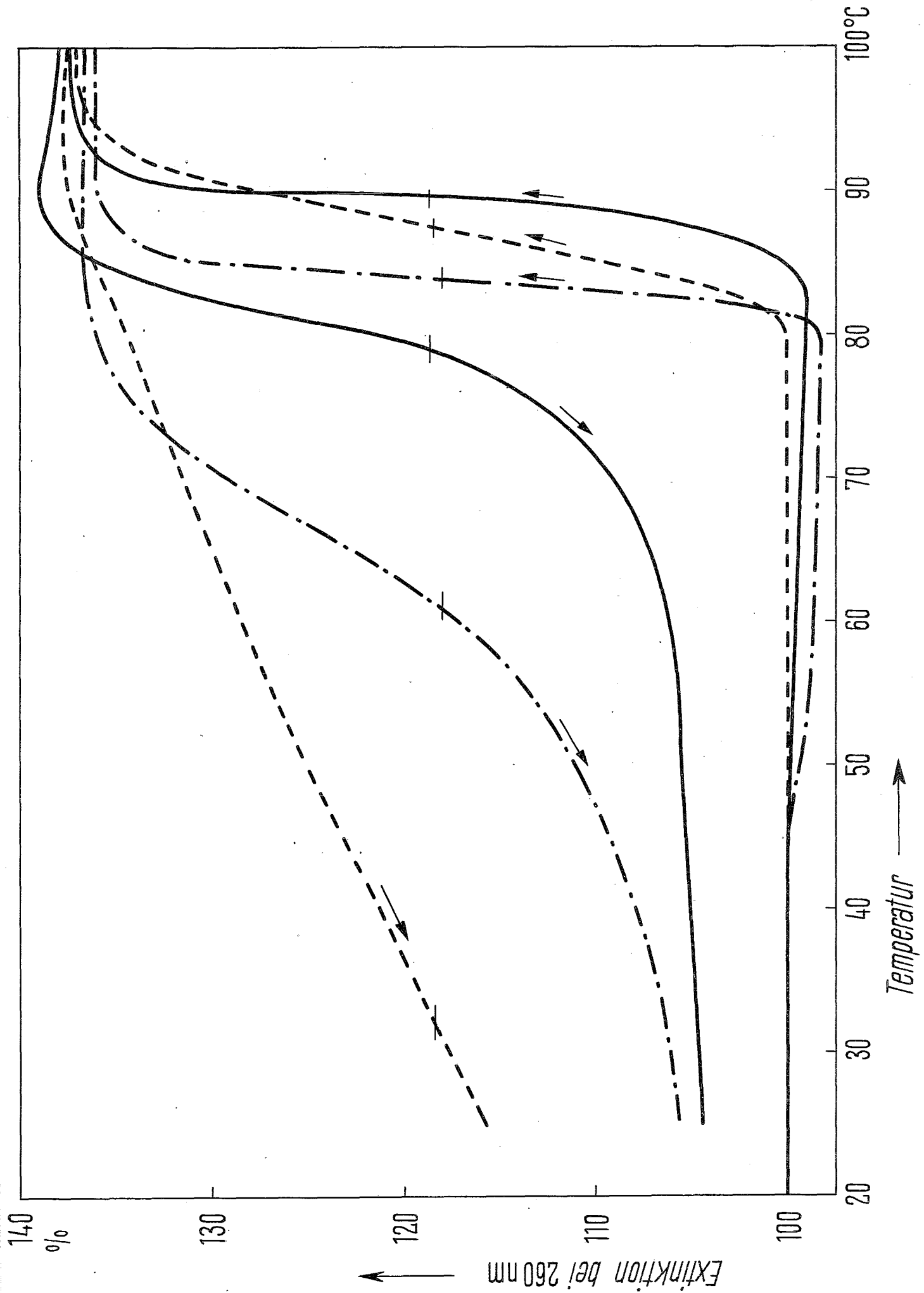


Abb. 21: Schmelzprofile (↑) und Renaturierungskurven (↓)
bestrahlter Lösungen von T1-DNA

———— Kontrolle, - - - - - 2 krad,
-x-x- 4 krad, ----- 7,7 krad.

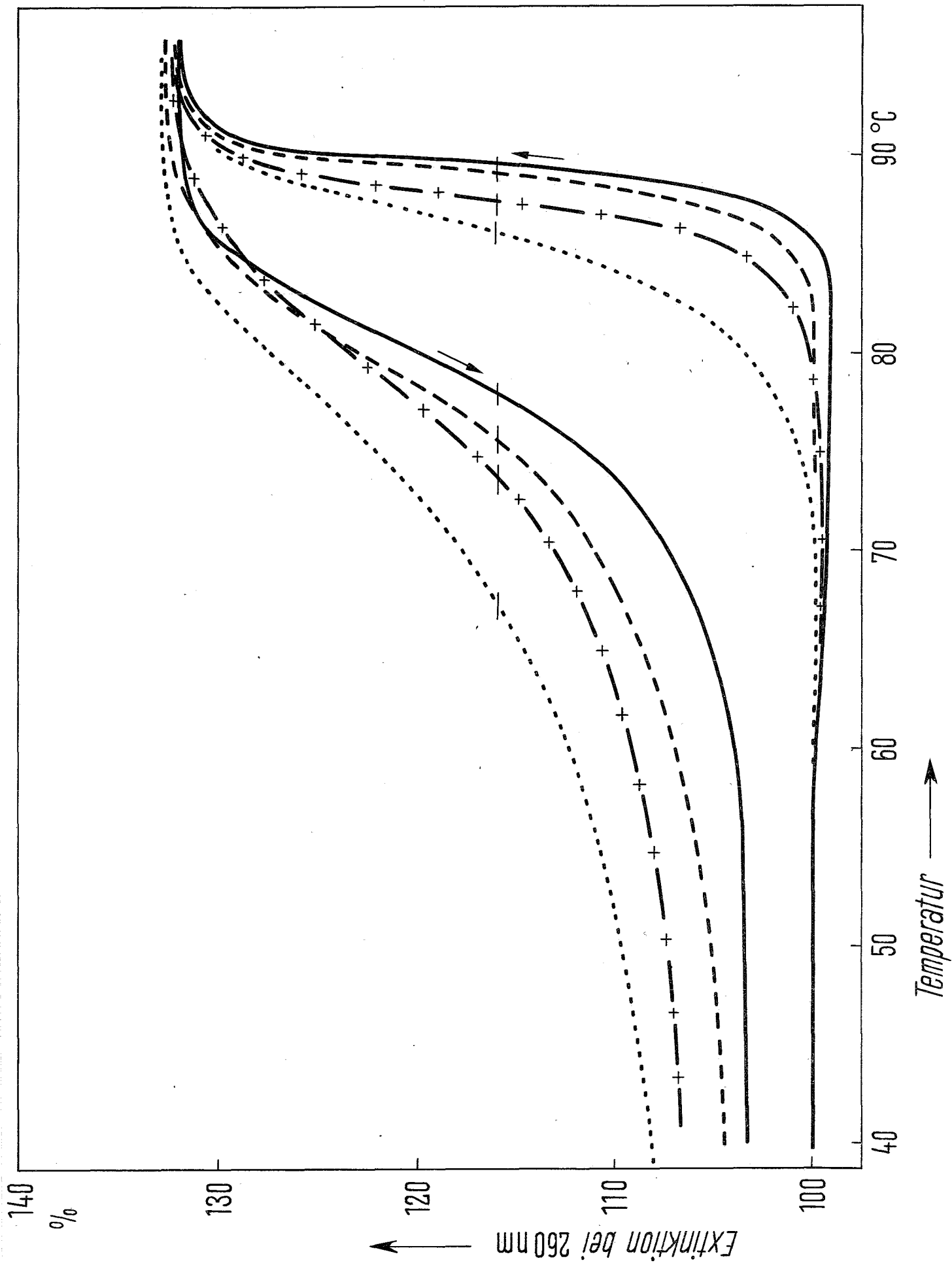


Abb. 22: Schmelzprofile (↑) und Renaturierungskurven (↓)
von DNA bestrahlter T1-Phagen.

———— Kontrolle, - - - - 500 krad, ----- 750
krad.

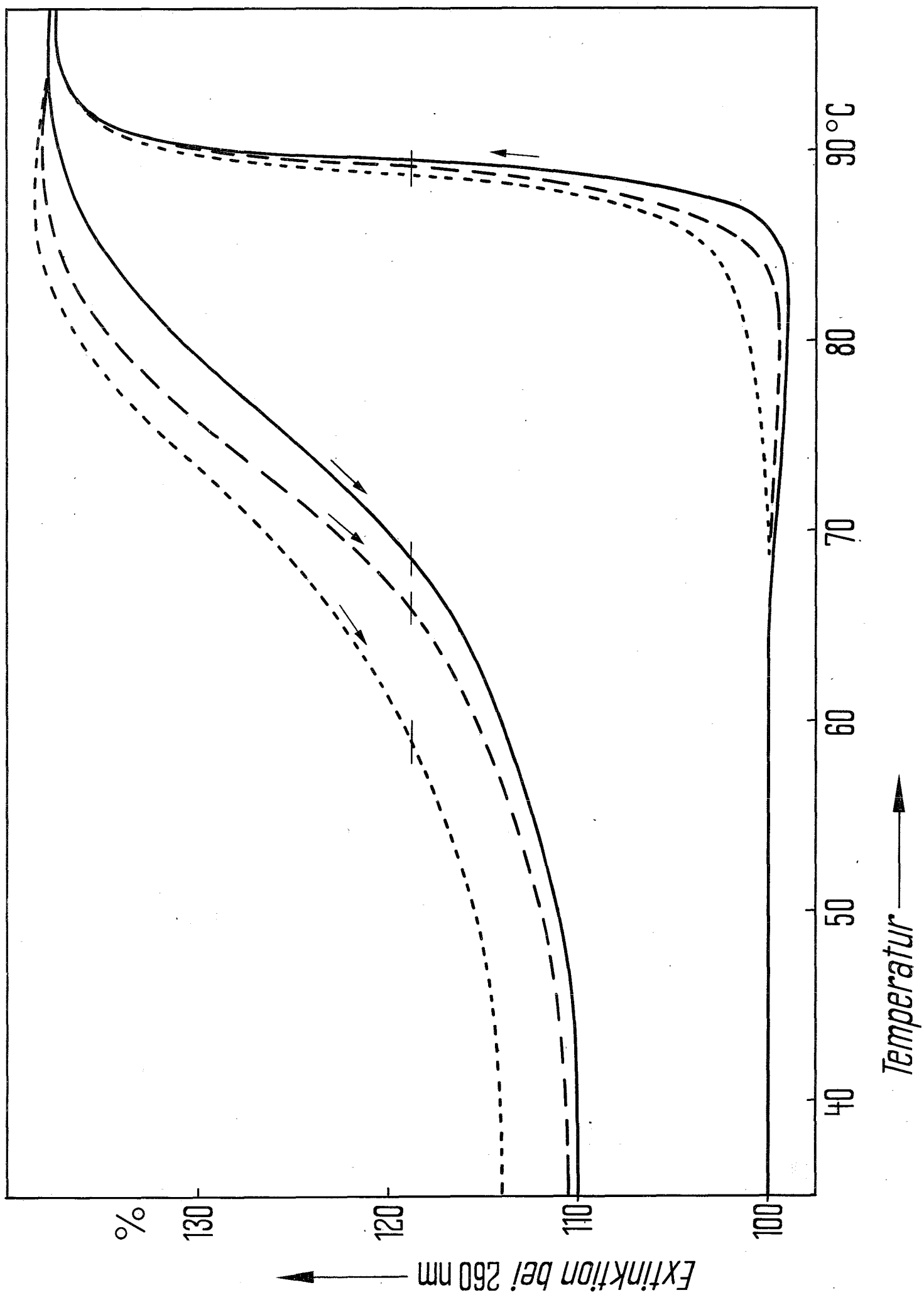


Abb. 23: Bruchteil der aktiven Phagen (●) und Bruchteil der nicht geschädigten Moleküle ermittelt aus den Gradienten (○) und aus den Molekulargewichtsverteilungen (o) in Beziehung zur Dosis.

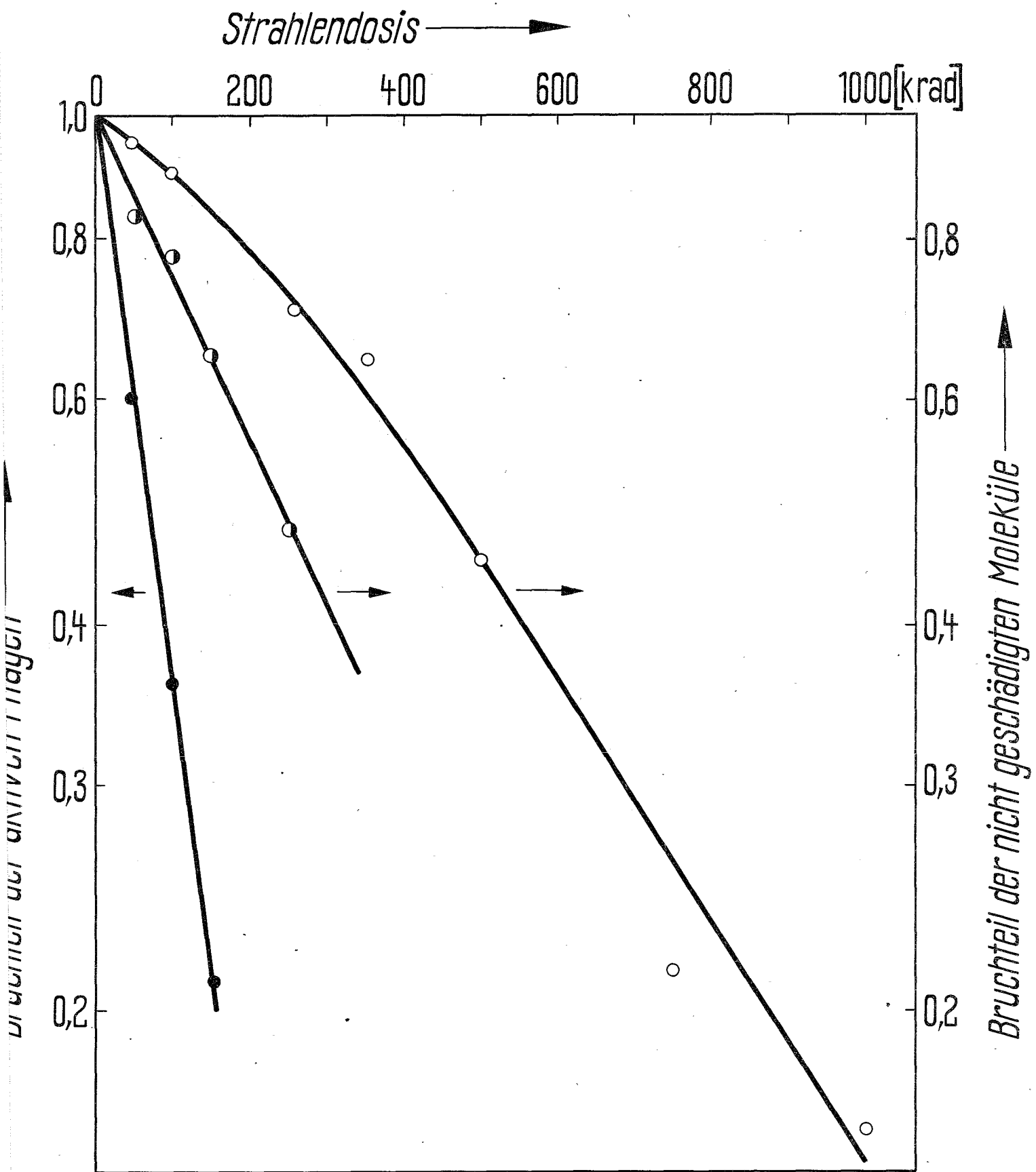


Abb. 24: Vergleich der Molekulargewichtsverteilungen einer in Lösung bestrahlten DNA (200 μ g, N₂, 4 krad, ●) und von DNA bestrahlter Phagen (350 krad, ○).

