

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

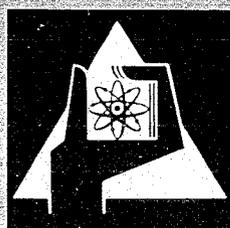
Februar 1969

KFK 934

Institut für Strahlenbiologie

Untersuchungen über die chemische Natur der
strahlenbedingten Brüche in Polydesoxyribonukleotiden

M. Simon



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.
KARLSRUHE

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Februar 1969

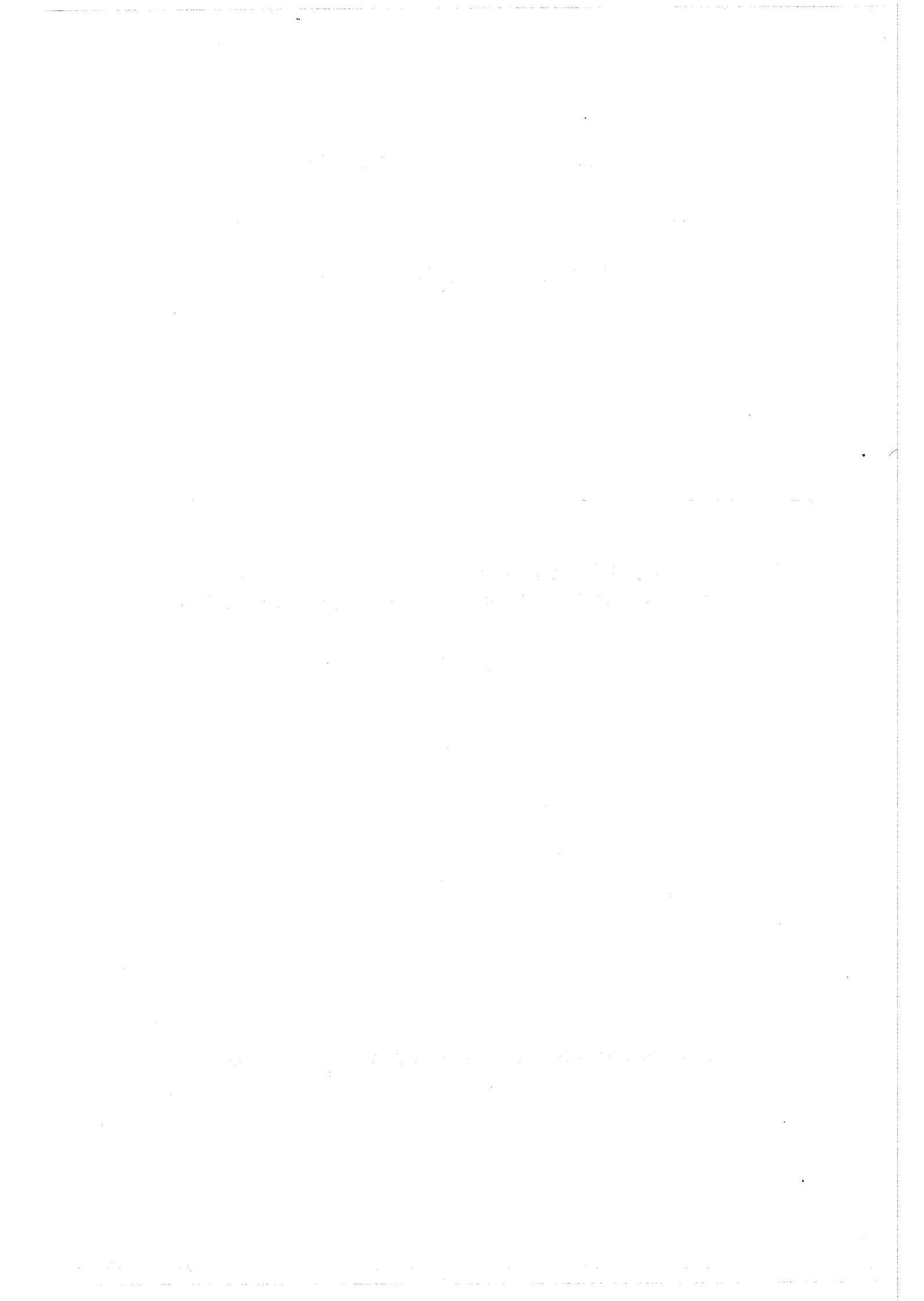
KFK 934

Institut für Strahlenbiologie

Untersuchungen über die chemische Natur der
strahlenbedingten Brüche in Polydesoxyribonukleotiden

Michel Simon

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe



Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
A.1 Strahlungsbedingte Brüche an der DNS in Lösung	1
A.2 Feststellung der Alkalilabilität bestrahlter DNS	4
A.3 Eigenschaften der Dialkyl-Phosphatbindung	5
A.4 Mechanismen, die über die Alkalilabilität der DNS Aufklärung geben könnten	6
B. Prinzip der Methoden und Durchführung der Versuche	9
B.1 Chromatographie-Verfahren	10
B.2 Analyse der primären Bestrahlungsprodukte	11
B.3 Analyse der durch Alkali-Behandlung entstandenen Abbauprodukte	12
B.4 Auswahl der Strahlendosis	12
C. Ergebnisse und ihre Auswertung	13
C.1 Rechromatographie des Peak 0	13
C.2 Rechromatographie des Peak II	14
C.3 Rechromatographie des Peak II 2	15
C.4 Rechromatographie des Peak III	16
C.5 Rechromatographie des Peak IV nach Alkali-behandlung	18
C.6 Chromatographie einer bestrahlten DNS-Lösung nach Alkalibehandlung	22
C.6.1 Chromatographische Trennung der Basen und Nukleoside (Peak 0)	24
C.6.2 Rechromatographie des Peak IV	25
C.6.2.1 Rechromatographie des Peak IV'5	27
C.6.2.2 Rechromatographie des Peak IV'4	27
C.6.2.3 Kettenlängenbestimmung des Peak IV'4-4	28
C.7 Untersuchungen über die Alkalilabilität von bestrahlter hochmolekularer DNS	29

D.	Diskussion	31
D.1	Identifizierung der gefundenen Spaltprodukte in bestrahlter DNS	32
D.2	Alkalilabilität der bestrahlten Oligo- nukleotide	33
D.3	Alkalilabilität hochmolekularer DNS	35
D.4	Basenabspaltung und Kettenbrüche	36
E.	Experimenteller Teil	37
E.1	Reagenzien	37
E.2	Enzym und Kettenlängenbestimmung	38
E.3	UV-spektroskopische Messungen	39
E.4	Isolierung der hochmolekularen DNS	39
E.5	Bestrahlungsbedingungen	39
E.6	Säulenchromatographische Methoden	40
E.6.1	DEAE-Sephadex A ₂₅	40
E.6.2	DEAE-Cellulose-Acetatform	41
E.6.3	Dowex 1 x 8 Acetat-Form	41
E.6.4	Dowex 50 x H ⁺ -Form	42
E.6.5	Dünnschicht-Chromatographie- Elektrophorese	42
E.7	Entsalzung	42
F.	Zusammenfassung	44
G.	Literaturverzeichnis	46
H.	Tabellen und Abbildungen	52

A. Einleitung

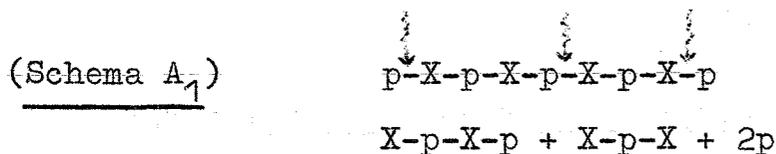
Mit physico-chemischen Methoden, wie die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten in der analytischen Ultrazentrifuge, die Viskosimetrie und die Lichtstreuung, lassen sich zwar strahlenbedingte Spaltungen an makromolekularer DNS bestimmen, es kann aber dabei nur wenig Aufschluß über die chemische Natur der Bruchenden erhalten werden, wie auch nicht über den Mechanismus, aus dem sie hervorgehen. Verschiedene strahlenchemische Untersuchungen, besonders die von G. Scholes und J.J. Weiss erlauben jedoch, daß man sich darüber ein genaueres, wenn auch noch unvollständiges Bild machen kann.

A.1 Strahlungsbedingte Brüche an der DNS in Lösung

Nach Scholes (1952), später Emmerson u.a. (1960) ist die Spaltung der Nukleotidenketten im wesentlichen eine Folge des Bruches der Kohlenstoff-Phosphatbindungen. Sie wird ausgelöst durch einen direkten Angriff der Strahlenprodukte des Wassers auf den Zucker. Der Oxydation des Zuckers folgt ein hydrolytischer Prozess.

1958 haben Cox u.a. durch acidimetrische Titration von Proben bestrahlter DNS die Freisetzung von sauren Gruppen nachgewiesen: sekundäre Phosphatgruppen ($pK'a = 6,7$) und wahrscheinlich auch Carbonylgruppen, die durch den radikalischen Angriff auf das C5-Atom des Zuckers entstehen. Sie haben daraus geschlossen, daß die Degradierung der DNS zum größten Teil aus der Spaltung der Phosphodiester-Bindung hervorgeht, da nach Alexander und Fox (1955) die O-P-Bindungen sehr strahlenresistent sind. Aus der Verschiebung der Kurven bei der Rücktitration der DNS nach relativ hoher Dosis schließen Cox u.a. (1958), daß wenigstens einige gespaltene Bindungen einen monophospho-veresterten Rückstand hinterlassen und daß einige Oxydationen auf dem Zuckerring entstehen.

Die Anwesenheit von endständigem Phosphat, das mit Monophosphoesterase bestimmt wurde, haben auch G. Scholes (1960) und Collyns u.a. (1965) bewiesen. 1954 hatten G. Scholes u.a. schon gezeigt, daß in den wässrigen, γ -bestrahlten DNS-Lösungen im allgemeinen nur wenig freies Phosphat gefunden wird. Die Freisetzung des Phosphates entstände dabei aus einem direkten radikalischen Angriff auf die endständigen Monophosphoester. Entsprechend nimmt die Ausbeute an freiem Phosphat mit steigender Dosis zu, da solche endständige Phosphat-Gruppen erst im Laufe der Bestrahlung gebildet werden. Man könnte also folgendes Schema annehmen:



Dabei stellen p die Phosphat-Gruppen, X die Nukleoside dar.

Obwohl die Wahrscheinlichkeit eines gleichzeitigen Angriffs an zwei benachbarten Zuckern klein ist, ist indessen nach J.A.V. Butler und Conway (1953) diese Wahrscheinlichkeit nicht gleich Null. Pro freigesetztes Phosphat entständen zwei hydroxylierte Bruchenden.



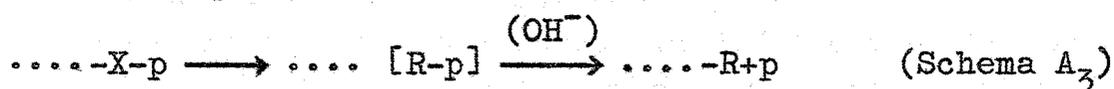
Dabei unterscheiden sich A₁ und A₂ nur durch ihre zeitliche Reihenfolge.

M. Daniels u.a. (1956) beobachteten bei Röntgen-Bestrahlung wässriger DNS-Lösungen, daß die Freisetzung von Orthophosphat noch längere Zeit nach Bestrahlung anhält. Sie vermuten, daß primär labiles Phosphat gebildet wurde, das anschließend langsam abhydrolysiert. Diese Hydrolyse wurde durch Alkali katalysiert und nimmt bei einer Erhitzung auf 90 °C beträchtlich zu. Es wurde angenommen,

daß die durch einen primären Angriff geschädigten, möglicherweise oxydierten Zucker die Hydrolyse und die Abspaltung der Phosphat-Gruppen erleichtern. Diese labilen Phosphate sind für die "Post-irradiation" Phosphat-Freisetzung verantwortlich, die im Fall von Ribonukleotiden bei 25 °C und pH = 7 etwa 30 Stunden fort dauert.

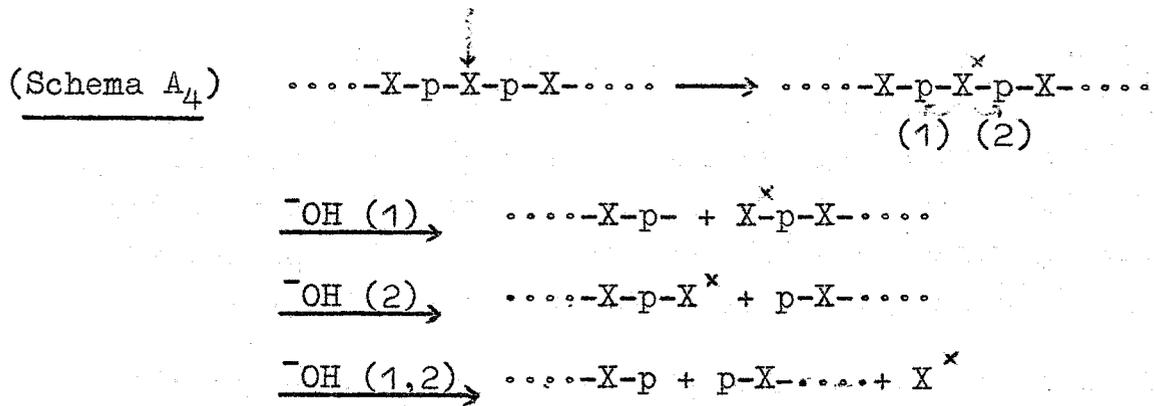
Die Freisetzung von Phosphat nach der Bestrahlung ist wesentlich größer, wenn man nicht hochmolekulare DNS, sondern Nukleotide bestrahlt (Daniels u.a. 1955). Man kann diesen Unterschied erklären, indem man annimmt, daß die Bildung des labilen Phosphates bei 25 °C einen oxydativen Angriff des endständigen Zuckers - was bei den Nukleotiden immer der Fall ist - voraussetzt. Bei der DNS würde ein radikalischer Angriff im Innern der Kette zuerst eine Labilisierung der Kohlenstoff-Phosphatbindung hervorrufen. Bei Erhitzung bzw. Alkalisierung des Milieus tritt dann eine Hydrolyse ein. Diese Hydrolyse würde dann die Kette weiter spalten, wobei noch zusätzlich nach der Bestrahlung Phosphat freigesetzt wird. Nach diesen Ergebnissen ließe sich die Freisetzung von Phosphat im alkalischen Milieu nach folgenden Mechanismen erklären:

Erfolgt die Oxydation des Zuckers am endständigen Nukleotid, so ergibt sich



Hierbei stellt den Kettenrest und R ein Nukleosid mit geschädigtem, möglicherweise oxydiertem Zucker dar.

Erfolgt der Angriff auf einen Zucker im Innern einer Kette, so kann die Kohlenstoff-Phosphatbindung nach Alkalibehandlung gespalten werden und so zum Bruch der Nukleotidkette führen:



A.2 Feststellung der Alkali-Labilität bestrahlter DNS

Ein Versuch bestätigte klar die Bildung von Oligonukleotiden nach alkalischer Inkubation bestrahlter DNS (Abb. 1). Wenn man eine Lösung von DNS aus Kalbsthymus mit 1 %iger Perchlorsäure fällt, findet sich etwa 2 % säurelösliches UV-absorbierendes Material. Inkubiert man diese DNS 48 Stunden bei 37 °C und pH 8,3, so steigt dieser Anteil auf 4 - 5 % an. Eine entsprechende Beobachtung wurde an bestrahlter DNS gemacht. Hierbei ist der Anteil an säurelöslichen Fraktionen größer, ebenso steigt dieser Anteil nach alkalischer Inkubation an. Die Dosis-Abhängigkeit des säurelöslichen Anteils vor und nach Inkubation bei pH 8,3 bei 37 °C für 48 Stunden zeigt die Abb. 1. Ohne Vorinkubation steigt der säurelösliche Anteil nach Bestrahlung an. Nach Inkubation ist dieser Anteil, der Oligonukleotide enthält, um etwa 3 % höher, zunächst unabhängig von der verabreichten Dosis. Nach sehr hohen Dosen, die zu einer mittleren Kettenlänge unter 100 führen (vgl. Abb. 2), wird dieser zusätzliche säurelösliche Anteil deutlich größer.

Die verschiedenen Mechanismen der Alkali-Labilität bedürfen nun aber einer experimentellen Nachprüfung. Die folgenden Untersuchungen waren deshalb darauf ausgerichtet, den Mechanismus der Alkali-Labilität zu klären. Dabei ergeben sich dann auch Hinweise, welche Reaktion bei einer Entstehung des strahlenbedingten Bruches der Nukleo-

tidkette beteiligt sind. Zunächst ist es jedoch vielleicht erforderlich, uns die Eigenschaften der Dialkyl-Phosphatbindung im alkalischen Milieu ins Gedächtnis zurückzuführen.

A.3 Eigenschaften der Dialkyl-Phosphatbindung

Es ist schon lange bekannt (Cavalier 1898 und Kosolapoff 1950), daß die Dialkylphosphoester gegenüber der Wirkung von Alkali stabil sind. Nach Bailly und Gaumé (1935) und Baer und Kates (1948) wird jedoch die Esterbindung nach Alkalibehandlung gespalten, wenn sich nahe bei den Phosphatgruppen (α und/oder β -Stelle) eine OH-Gruppe befindet. Brown und Todd (1952) erklären den Mechanismus der Hydrolyse der hydroxylierten Dialkylphosphate, indem sie ein zyklisches Zwischenprodukt annehmen:

So entsteht z.B. bei der alkalischen Hydrolyse von 2 Methyl-Phosphat-Glycerin (I) (Schema A₅) ein Intermediär (II), das sofort in Methanol und Zyklophosphat zerfällt. Im stark alkalischen oder im sauren Medium wird dieses Zyklophosphat weiter in α - und β -Glycerin-Phosphat gespalten (III).

Die Anwesenheit der OH-Gruppe am C₂-Atom der Ribose erklärt die Alkalilabilität der RNS im Gegensatz zu der Alkalistabilität der DNS. Schon unter der Behandlung mit 1 n Alkali bei Zimmertemperatur erfolgt die quantitative Aufspaltung der RNS zu den Mono- Nukleotiden durch einen ähnlichen zyklischen Mechanismus (Brown und Todd 1952), der durch Exklusiv-Spaltung der C₅'-OP-Bindung zu dem Zyklophosphat-Nukleosid führt. Dies ist in Schema A₆ dargestellt, wobei C₂-C₃-C₅ schematisch die Position der Kohlenstoffatome im Zucker bedeuten.

Diese Bestandteile wurden von Markham und Smith (1952) in verdünntem NH₄ OH isoliert. Nach diesem Mechanismus entsteht zunächst ein 5'-OH Ende sowie ein endständiges Zyklophosphat, das durch eine weitere Hydrolyse zu einer

Mischung von 2- und 3-Phosphat-Nukleosiden führt. Im Gegensatz dazu wird die DNS, solange die Struktur ihrer Bausteine noch intakt ist, nicht angegriffen. Sind jedoch nach einer Bestrahlung Basen abgespalten - was zu einer OH-Gruppe am C'-4-Atom des Zuckers führt - oder sind oxydierte Gruppen am Zucker vorhanden, so wird die DNS durch Alkali angreifbar. Diese oxydierten Gruppen müßten in α - oder β -Position zur Phosphat-Gruppe stehen.

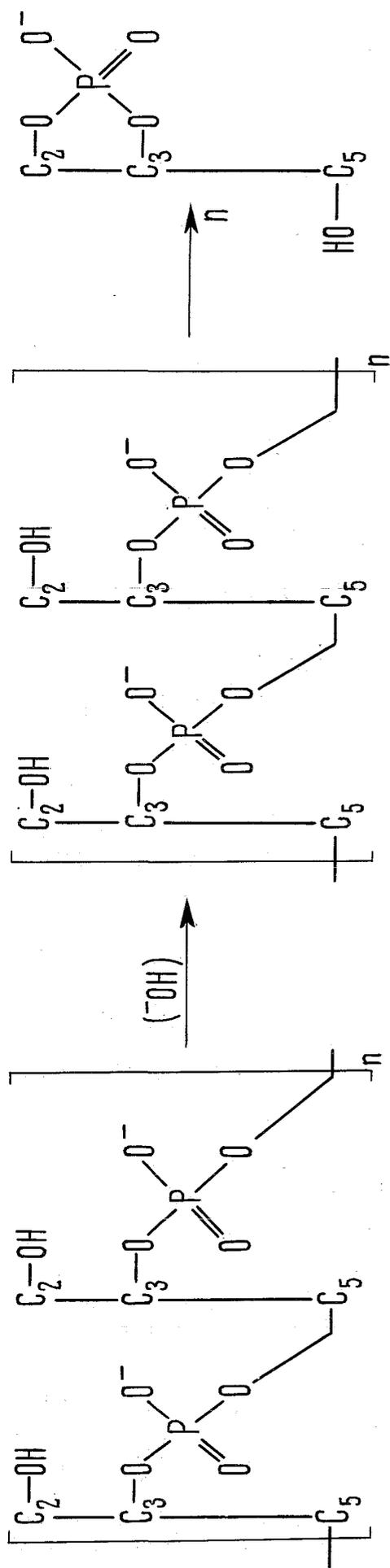
A.4 Mechanismen, die über die Alkalilabilität der DNS Aufklärung geben könnten

Es ist bekannt (Tamm u.a. 1953), daß Apurinsäure sich durch Alkali degradieren läßt. Zwei Typen von Mechanismen wurden für diese alkalische Degradierung gefunden:

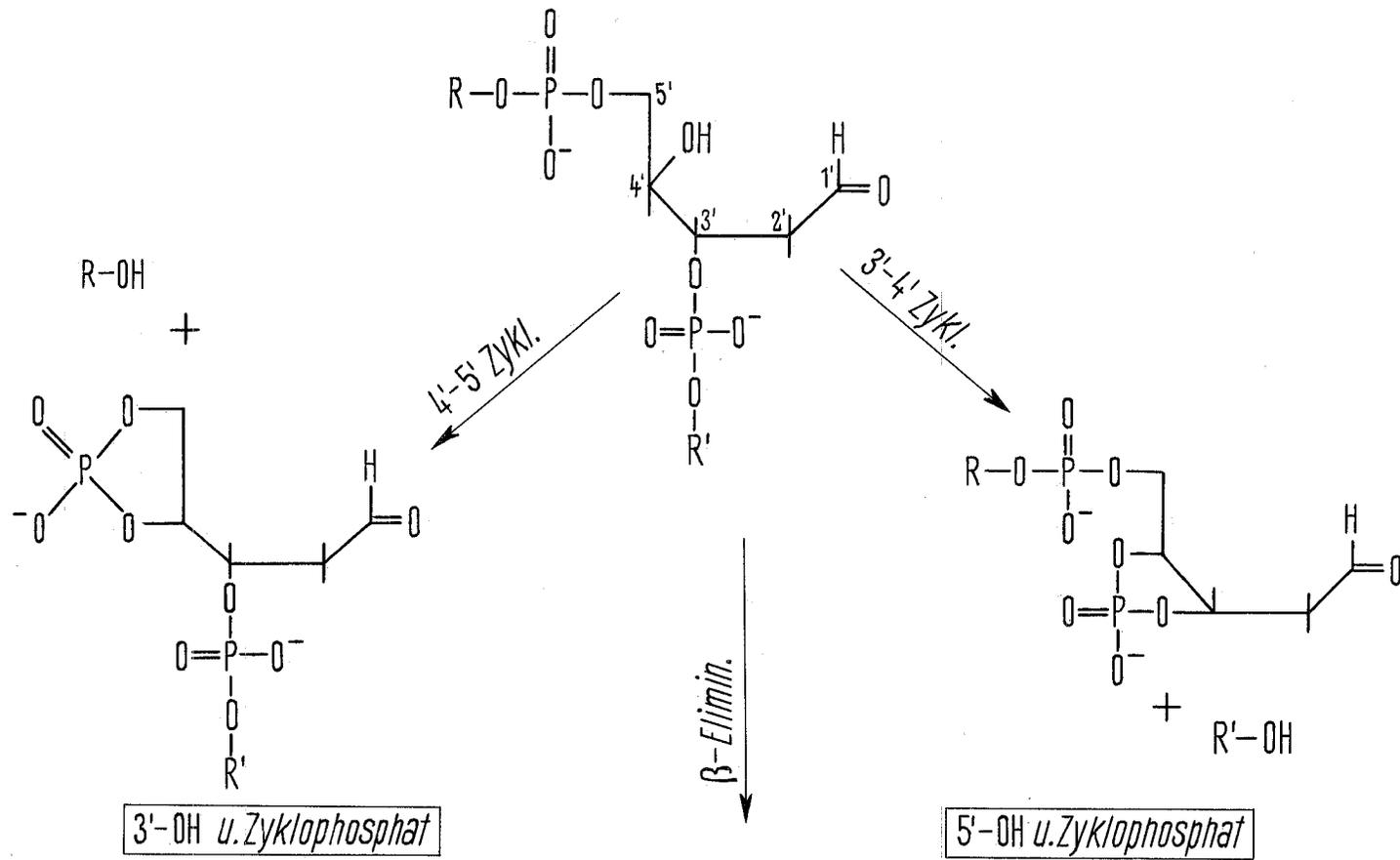
1. Zyklisierung: entweder an der 3'-4'-Stelle oder an der 4'-5'-Stelle (Tamm u.a. 1953)
2. β -Eliminierung (Brown und Todd 1955), d.h. die Eliminierung der Phosphat-Gruppe in β -Stellung zur Carboxylgruppe.

Nach C.R. Bayley u.a. (1961) verläuft dieser Prozess nach dem Schema A₇, wobei R und R' den Kettenrest bzw. H darstellen.

Bei der 4'-5'-Zyklisierung und der β -Eliminierung wird die 3'-Phosphatbindung des am nächsten liegenden Nukleotids gespalten, aber nur der erste Mechanismus erzeugt eine 3'-OH-Endgruppe und ein Zyklophosphat, während der zweite 5'-Phosphat-Endgruppen erzeugt sowie ein aus dem Zucker entstandener Aldehyd als Endgruppe. Die 3'-4'-Zyklisierung spaltet die 5'-Phosphatbindung des am nächsten liegenden Nukleotids und erzeugt 5'-OH-Endgruppen und Zyklophosphat. Wenn R' ein H-Atom darstellt, wird die β -Eliminierung Orthophosphat freisetzen.



Schema A₆



Schema A₇

5'-P u. ungesättigter Aldehyd

Ein ähnlicher Mechanismus, der auch eine Basen-Freisetzung impliziert, wurde neulich von Rhease und Freese (1968) vorgeschlagen (Schema A₈). Dieser Mechanismus betrifft die Wirkung von OH-Radikalen an der DNS. Hierbei wird die Base durch einen OH-Angriff am C₁-Atom der Desoxyribose freigesetzt. Dadurch wird Desoxyribon-Säure - die isoliert und charakterisiert wurde - erzeugt. Daraus geht im alkalischen Medium der Bruch der Zucker-Phosphatbindung entweder durch Zyklisierung oder durch β -Eliminierung hervor. Dieser letzte Mechanismus tritt vermutlich bevorzugt ein. Im ersten Schritt wird wahrscheinlich ein H-Radikal vom C₁-Atom abstrahiert (I). Das entstandene Radikal (II) reagiert sofort mit weiteren Radikalen, vor allem mit .OH. Es entsteht daraus die Verbindung (III). Bei pH = 7,5 ist (III) instabil - wenigstens wenn die Base Adenin ist - und zerfällt zu freier Base und dem Lacton (IV). Dieses Lacton ist bei Neutralität stabil, hydrolysiert aber langsam bei pH-Werten über 7,0 in den Bestandteil (V), die 3'-5'-disubstituierte 2'-Desoxyribonsäure. Nach den drei Mechanismen des Schemas A₇ kann sich dann (V) weiter zersetzen, wobei die Phosphodiesterbindung gespalten wird.

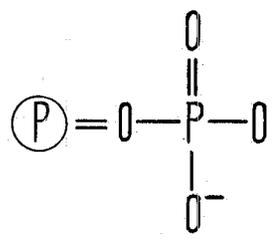
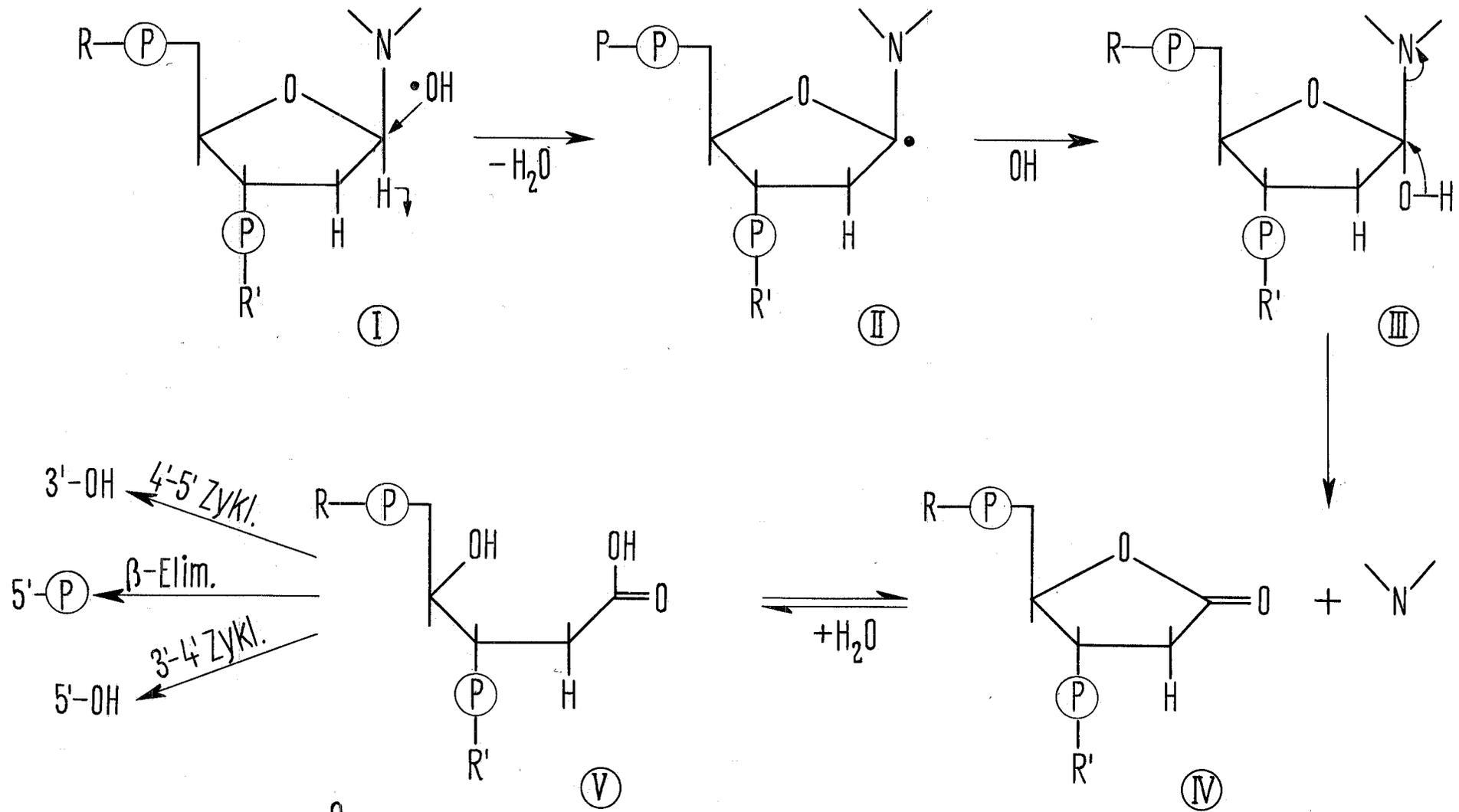
Merken wir uns hier, daß ein Bestandteil wie III, der eine OH-Gruppe in β -Position der Phosphoester-Bindung besitzt, was das H-Atom von C₂ saurer macht, genügen würde, um eine β -Eliminierung zu ermöglichen. Tatsächlich wurde die Labilität des Bestandteils III bei pH 7,5 - 9 nur in dem Fall wo Adenin - also eine Purin-Base - vorhanden ist, bewiesen. Nun aber wissen wir (Pullman 1963), daß die N-glycosidischen Bindungen der Pyrimidin-Basen resistenter sind. Dies macht nicht unwahrscheinlich, daß wenigstens ein Teil der Transformation bei Schritt III verbleibt und dann eine β -Eliminierung ohne Basen-Freisetzung eintritt.

Dem entsprechend wurde kürzlich (Bernhard und Snipes 1968) durch ESR-Analyse γ -bestrahlte 3'-Cytydilsäure im Einkristall die Bildung einer Carbonylgruppe am C₁-Atom des Zuckers ohne Freisetzung der Base nachgewiesen. Den Autoren zu Folge, könnte einer H-Abstraktion am C₁-Atom

(Gordy) eine Spaltung der C-O-Bindung folgen mit anschließender Wanderung des einzelnen Elektrons zum C₄-Atom und Bildung einer Doppelbindung zwischen dem O-Atom und C₁-Atom. Schema A₉ verdeutlicht diesen Mechanismus. Die Anwesenheit einer Carbonylgruppe am C₁-Atom würde dann in alkalischem Milieu die β -Eliminierung des Phosphats mit entsprechendem 5'-Phosphatende ermöglichen.

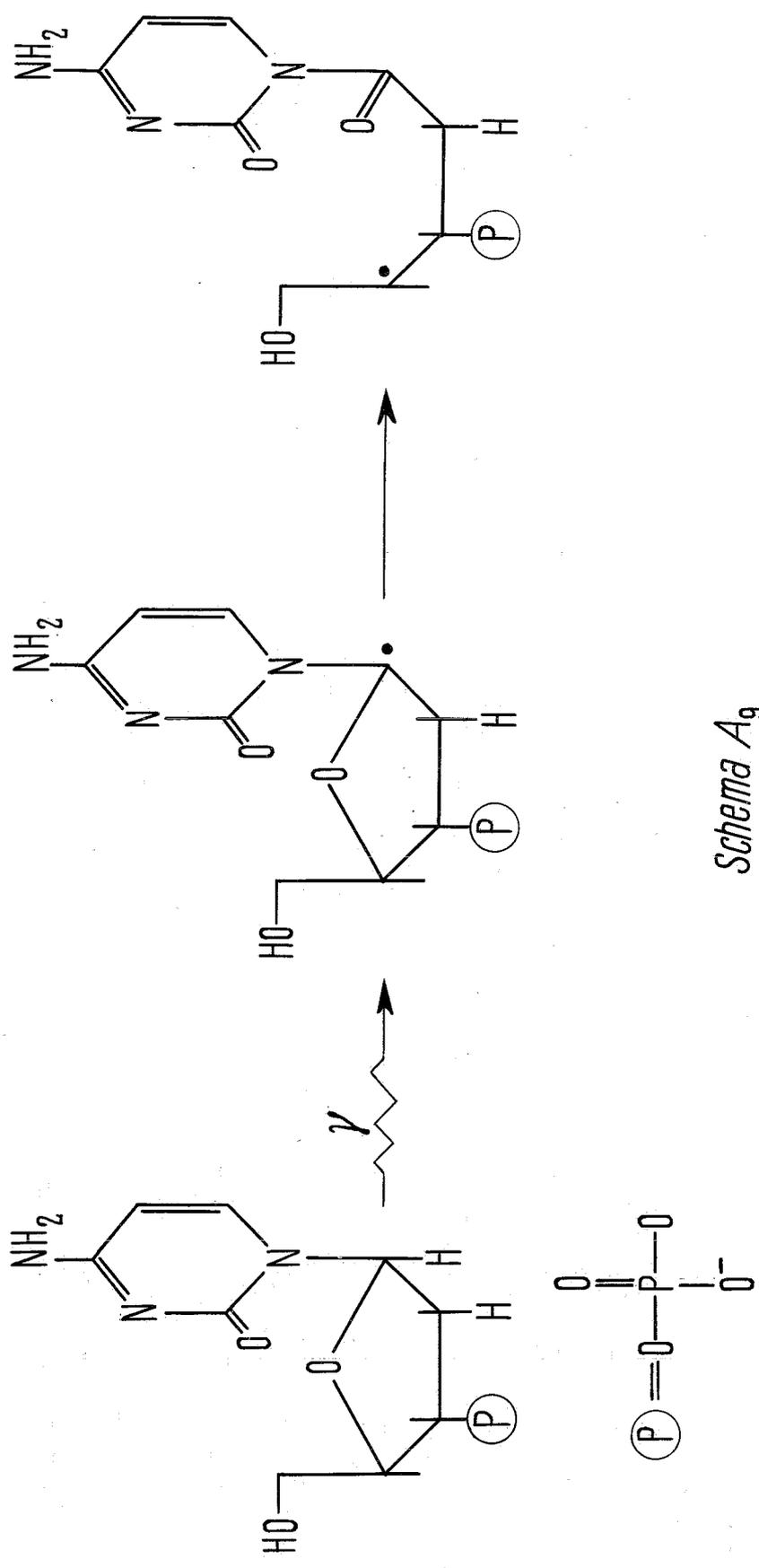
Ein anderer Mechanismus, der bestrahlte DNS betrifft, wurde von J.J. Weiss (1964) vorgeschlagen. Der Autor schreibt die strahlenbedingte Labilität der Zucker-Phosphat-Bindung und die Freisetzung labiler Phosphate der Oxydation der Alkohol-Gruppen am C₃-, C₄- oder C₅-Atom der Desoxyribose zur Keto- bzw. Aldehydgruppe zu. Dadurch wäre eine β -Eliminierung der so erzeugten instabilen β -Keto- bzw. β -Aldehydphosphoester ermöglicht. Die Anwesenheit solcher aktiver Carbongruppen am Zucker wurde nach Bestrahlung von DNS-Lösungen von Koshland (1957) und Cox (1958) nachgewiesen.

Mit dieser Oxydation am C₃-, C₄- oder C₅-Atom ist nicht unbedingt eine Freisetzung der Base verbunden. Es müßte dazu ein weiterer radikalischer Angriff in Betracht gezogen werden. Bei dieser Oxydation spielen OH-Radikale die wichtigste Rolle, obwohl H-Radikale auch an der Dehydrierung des Zuckers mit einem G-Wert von 0,4 beteiligt sind. Weiss (1964) beobachtete indessen, daß der Betrag an freigesetztem, labilem Phosphat von AMP virtuel in An- oder Abwesenheit von Sauerstoff derselbe ist. Dies macht wahrscheinlich, daß das durch H-Abstraktion einer Alkohol-Gruppe entstandene primäre Radikal bei dem nächsten OH-Angriff bevorzugt oxydiert wird. Diese Annahme wird durch die oben erwähnten Befunde von Bernhard und Snipes bestätigt. Außerdem suggeriert die ESR-Spektroskopie von Desoxyriboseeinkristallen, daß ein Radikal nach H-Abstraktion am C₅-Atom des Zuckers gebildet wird, was nach einem sekundären OH-Angriff zu einer C₅-Carboxyl-



$R, R' = \text{Kettenrest, H}$

Schema A₈



Schema A₉

gruppe führen kann. Diese Gruppe würde dann eine β -Eliminierung der am C_3 -Atom gebundenen Phosphatgruppe ermöglichen (Weiss 1964).

Die oben erwähnten Mechanismen zeigen jeweils die Oxydation der einzelnen C-Atome des Zuckers, ausgenommen vom C_2 -Atom. Eine Transformation der Desoxyribose zur Ribose durch OH-Addition am C_2 -Atom würde diese Oxydationsmöglichkeit am Zucker ergänzen (Butler 1956). Dafür sprechen zuerst eine von Cox (1958) und Keck (1966) beobachtete Abnahme des Dische-Wertes der bestrahlten DNS; weiter wurde die Anwesenheit von Ribotiden im enzymatischen Hydrolysat von bestrahlter DNS von Keck (1966) vermutet. Die Alkalilabilität wäre dann der der RNS identisch, die durch 2'-3'-Zyklisierung 5'-OH-Endgruppen hervorruft.

B. Prinzip der Methoden und Durchführung der Versuche

Betrachten wir nun wieder eine bestrahlte hochmolekulare DNS. Durch Bestrahlung entstehen Einzel- wie Doppelbrüche. Nur wenn zwei Einzelbrüche in zwei gegenüberliegende Strängen ~~nicht~~ beieinander liegen, wird es zu einem Doppelbruch kommen. Sonst werden die strahlenbedingten Teilstücke weiterhin zusammenhalten. Denaturiert man die DNS, z.B. durch Zusatz von konzentriertem Harnstoff (7 m), so lösen sich die Teilstücke. A priori sind dihydroxylierte, mono- und diphosphorylierte Polynukleotide zu erwarten. Ferner sind nach Alkaliinkubation Zyklophosphate und durch Bestrahlung veränderte Zucker als Endgruppe möglich. Es erschien deshalb aussichtsreich, die Endgruppen der erhaltenen Bruchstücke näher zu analysieren.

Durch die obigen Überlegungen ist es zu erwarten, daß unter diesen Abbauprodukten, wenigstens einzelne, die einen oxydierten Zucker besitzen, durch Alkali-Behandlung weiter degradiert werden können. Wenn die bei der Bestrahlung gebildeten Oligonukleotide aus einer Zucker-

Oxydation entstehen (Weiss 1964), müssen sie zerstörte Nukleoside an bzw. neben den Bruchenden aufweisen. Wesentlich ist auch die Frage, ob eine Endgruppe eine Phosphatgruppe besitzt oder nicht. Es erschien deshalb zweckmäßig, ein Verfahren zu finden, das die Trennung der Strahlen-Produkte vor oder nach alkalischer Hydrolyse nach dem Wert der Phosphatgruppen erlaubt.

B.1 Chromatographie-Verfahren

Obwohl Desoxyribonukleotid-Homopolymere sich schnell nach Kettenlänge bis zu den Oktanukleotiden trennen lassen (Tener u.a. 1958), ist es doch nicht möglich, die Heteropolymere von Purin- und Pyrimidin-Basen mit einer Kondensation größer als vier zu trennen. Dies ist eine Konsequenz verschiedener sekundärer Kräfte zwischen dem Ionenaustauscher und den Purin- und Pyrimidin-Basen.

Tomlinson und Tener (1963a) haben eine Technik entwickelt, die durch Eliminierung dieser sekundären Kräfte die Trennung der Heteropolymeren erlaubt. Diese Trennung erfolgt, unabhängig von ihrer Basenzusammensetzung, nach ihrer gesamten negativen Ladung in 7 molarem gepufferten Harnstoff bei pH 7,6. Bei diesem pH ist die Dissoziation der Aminogruppen der Nukleotid-Basen vollständig unterdrückt. Die einzigen geladenen Gruppen sind in den Polynukleotiden die Phosphatgruppen, wobei die internukleotidprimären Phosphate sowie auch die endständigen Cyklophosphate eine Ladung tragen und die sekundären endständigen Phosphatgruppen (C) zwei Ladungen. Bei unseren Versuchen wurde das Trennungsverfahren von Tomlinson und Tener (1963a) nach Ruschizky u.a. (1964) durch Verwendung von DEAE-Sephadex verbessert.

B.2 Analyse der primären Bestrahlungsprodukte

Das oben erwähnte Trennungsverfahren (Tomlinson und Tener 1953b) ermöglicht nun eine Analyse der kürzeren Bestrahlungsprodukte. Als Beispiel für die Oligonukleotide, die bei einer Bestrahlung entstehen, kann man die drei in Schema B gezeigten Bestandteile (I, II und III) annehmen. Ferner können freie Basen, Mononukleoside oder längere Analoge gebildet werden. Die Bestandteile I, II und III werden bei pH 7,6 1, 3 und 5 negative Ladungen tragen. Es handelt sich in der Folge darum, das Gemisch in scharf abgeordnete Peaks zu trennen. Die Bestandteile I - mit einer Ladung - werden vor den Nukleotiden - mit 2 Ladungen - und nach den Nukleosiden und Basen - 0 Ladungen - eluiert.

Die Bestandteile III mit 5 Ladungen werden entweder zusammen mit den monophosphorylierten Tetranukleotiden, d.h. $XpXpXpXp$ (III_1) oder mit den dihydroxylierten Hexanukleotiden, d.h. $XpXpXpXpXpX$ (III_2) eluiert. Durch Monophosphoesterase-Behandlung werden die Bestandteile III und III_1 ihre endständigen Phosphate verlieren. So entstehen: $XpX(III')$ mit einer Ladung und $XpXpXpX(III'_1)$ mit drei Ladungen, die in einer Rechromatographie im selben System leicht von III_2 - das seine 5 Ladungen behalten hat - getrennt werden, da jeder Bestandteil sich um zwei Ladungen voneinander unterscheidet. Anschließend ist es möglich, durch Berechnung des Verhältnisses

$$\frac{OD\ 271\ (Nukleoside) + OD\ 271\ (Nukleotide)}{OD\ 271\ (Nukleoside)}$$

nach einer Behandlung mit einer gereinigten Exonuklease (siehe experimenteller Teil E.2) die Kettenlänge der Oligonukleotide zu bestimmen.

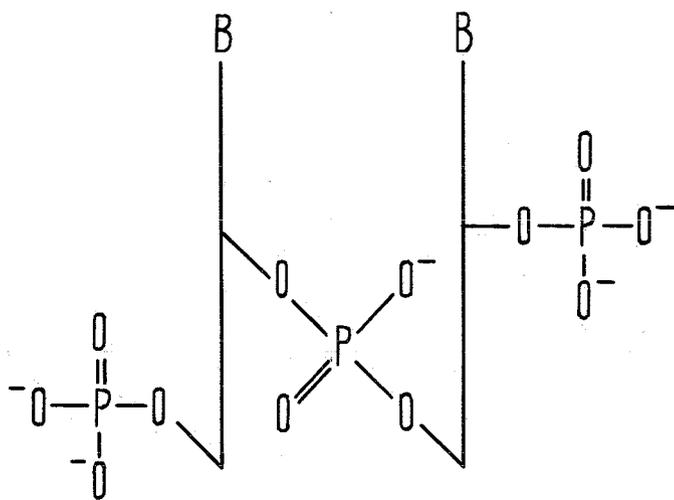
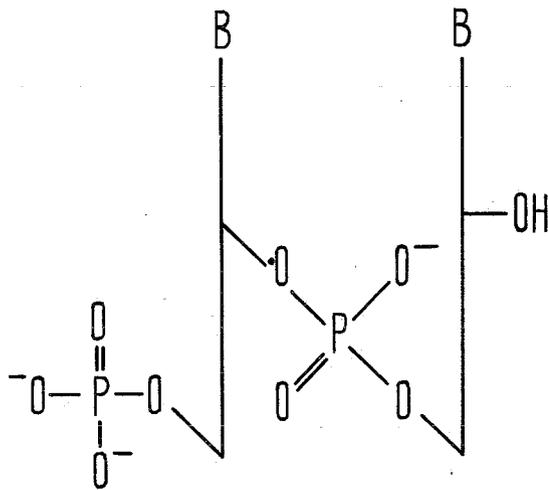
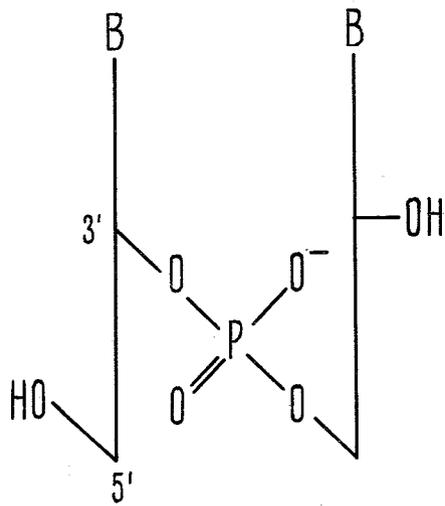
B.3 Analyse der durch Alkali-Behandlung entstandenen Abbauprodukte

Die Oligonukleotide, die aus einem Peak bestimmter Ladung entstehen, wurden einer alkalischen Behandlung unterworfen und werden, wie oben erwähnt, chromatographisch getrennt, d.h. ohne und nach Monophosphoesterase-Behandlung. Falls endständige Zyclophosphate vorhanden sind, soll eine schonende Säure-Behandlung, die zu einer zusätzlichen Ladung (Sekundär-Phosphat) führt, ihre Charakterisierung ermöglichen.

B.4 Auswahl der Strahlendosis

Zur Gewinnung genügender Mengen Bestrahlungsprodukte ist es erforderlich, eine günstige Dosis zu ermitteln, bei der 1. die Ausbeute an trennbaren niedermolekularen Abbauprodukten am größten ist, 2. die Zerstörungen, die an Basen einen Verlust der UV-Absorption hervorrufen, am geringsten sind, da die Mengen an Material durch Absorptionsmessungen charakterisiert werden müssen (siehe E.3).

Abb. 2 zeigt die Abnahme der mittleren Kettenlänge der DNS-Einzelketten in Beziehung zur verabreichten Dosis. Diese kann unter der Annahme eines G-Wertes von 0,4 für den Einzelbruch berechnet werden (Hagen 1967), wenn die Konzentration der DNS $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ beträgt. Es ergibt sich daraus, daß mindestens 200 KR gegeben werden müssen, die zu einer mittleren Kettenlänge von ca. 20 führen. Andererseits zeigen Versuche über die Extinktionsabnahme denaturierter DNS, daß nach 400 KR schon etwa 20 % der Basen zerstört sind. Es wurde deshalb diese Bestrahlungsdosis als obere Grenze genommen.



B=Base

Schema B

C. Ergebnisse und ihre Auswertung

Eine wässrige DNS-Lösung mit einer Konzentration von $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ wurde nach 10 Minuten Stickstoff-Anreicherung bestrahlt. Gleich nach der Bestrahlung wurde die Probe eingengt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 7 m Harnstoff pH 7,6 ohne NaCl gewaschen. Daraus lassen sich bereits die Basen und Nukleoside eluieren. Die Eluierung begann dann mit einem linearen NaCl-Gradienten in 7 m Harnstoff pH 7,6. Aliquote wurden im Fraktionssammler aufgefangen und jede Fraktion wurde danach bei $271 \text{ m}\mu$ gemessen.

Nach der Bestrahlung mit 200 KR beträgt die Ausbeute der so gewonnenen getrennten Oligonukleotide nur 16 % des eluierten UV-absorbierenden Materials. Deshalb wurde ein analoger Versuch mit 400 KR durchgeführt. Die Ausbeute betrug dann ca. 35 %, die weiter verarbeitet wurden. Es handelt sich dabei ausschließlich um Bestrahlungsprodukte, da in diesem Trennverfahren mit einer unbestrahlten DNS-Lösung weniger als 0,5 % UV-absorbierendes Material eluiert werden. Die Tab. 1 faßt die prozentuale Zusammensetzung der verschiedenen Fraktionen zusammen, wie sie sich nach diesen zwei Strahlendosen ergibt. Abb. 3 zeigt die Trennung eines solchen Ansatzes. In der Folge wurden die Peaks 0 bis III hauptsächlich, um eine Markierung des Elutionsprofils zu erhalten, analysiert. Die Elutionsstelle, die der Ladung II entspricht, wurde außerdem mit 5'-TMP markiert. Bei Peak IV, der genügend UV-absorbierende Materialien enthielt und gut getrennt war, wurde zusätzlich die Alkali-Labilität analysiert.

C.1 Rechromatographie des Peak 0

Nach Entsalzung wurde der Peak 0, der Nukleoside und Basen enthalten kann, über eine Dowex 50 x 4 (H^+)-Säule nach Cohn (1961) analysiert (Abb. 4). Mit 0,5 n HCl wurden die Nukleoside und mit 2 n HCl die Basen eluiert. Die Menge

der wie Nukleoside eluierten Substanzen betrug 54,2 %, die der den Basen entsprechende 45,8 % der wiedergefundenen OD 271. Die Ausbeute war 92 %. Um diese Produkte besser charakterisieren zu können, wurde eine weitere Trennung durch zweidimensionale Chromatographie-Elektrophorese auf Zellulose-Schichten bei pH 3,4 versucht. In diesem von Keck und Hagen (1964) entwickelten Verfahren liegen die Nukleoside und Basen als Kationen vor. Es wurde dann festgestellt, daß außer den vier unter der UV-Lampe erscheinenden Hauptflecken zehn nur sehr schwache sekundäre Flecken zu sehen waren, unter denen einige anionischen Produkten entsprechen. Dies scheint darauf hinzuweisen, daß die Hauptmenge der abgespaltenen Verbindungen intakte Nukleoside und Basen sind. Eine Auftrennung der einzelnen Basen wurde im Zusammenhang mit der Alkalilabilität der bestrahlten DNS vorgenommen (siehe C.6.1).

C.2 Rechromatographie des Peak II

Eine Vorschulter des Peak II (s. Abb. 3), die auf dem registrierten Chromatogramm besser als in Abb. 3 zu erkennen war, hat uns dazu veranlaßt, diesen Peak mit einem Gradienten, dessen Anfangsmolarität geringer war, zu rechromatographieren. Abb. 5 zeigt solche Auftrennung. Der Peak läßt sich mit einer Ausbeute von ca. 100 % in zwei Teile auflösen. Die prozentuale Zusammensetzung betrug für Peak II 1 13,1 % und für Peak II 2 86,9 % der gesamten eluierten Extinktion bei 271 m μ . Der Peak II 1 wurde mit der Milz-Exonuklease B in 3'-Phosphat-Nukleoside und Nukleoside hydrolysiert, auf eine DEAE-Cellulose-Säule (Acetat-Form) gegeben und das Verhältnis

$$\frac{\text{OD 271 Nukleoside} + \text{OD 271 Nukleotide}}{\text{OD 271 Nukleoside}}$$

gemessen (s. E.2). Es betrug 2,07. Es ergibt sich daraus, daß dieser Peak wesentlich aus XpX besteht. Der Peak II 2

hat dieselbe Elutionsmolarität an NaCl wie der Peak II in Abb. 3. Dies und das mit 200 KR erhaltene Chromatogramm bestätigen die Reproduzierbarkeit dieser Elutionsmolarität. Diese Tatsache wurde später ausgenutzt, um die kleinsten Fraktionen zu identifizieren.

C.3 Rechromatographie des Peak II 2

Der Peak II 2 kann - entsprechend den 2 Ladungen - lediglich Nukleotide (Xp) und/oder dihydroxylierte Trinukleotide (XpXpX) enthalten. Wegen dieser einfachen Zusammensetzung wurde dieser Peak der folgenden Analyse unterworfen.

Nach Entsalzung wurden etwa 15 OD 271 m μ mit Exonuklease B inkubiert. Das Hydrolysat wurde auf eine DEAE-Sephadex-Säule gegeben und mit 7 molarem Harnstoff, 0,02 n Tris, pH 7,6, also ohne NaCl, eluiert. Die Säule wurde dann mit einem linear ansteigenden Gradienten verbunden. Abb. 6 zeigt diese Trennung. Der Peak II 2a entspricht den Nukleosiden, der Peak II 2b den Nukleotiden. Der Peak II 2b' ist ein unverdaulicher Rest von XpXpX. Nach der Ausgangsmolarität (0,116 m) könnte man glauben, daß es sich um pXpX - das wegen eines 3'-Phosphats gegenüber der Wirkung der Exonuklease B resistent ist - handelt. Dies könnte bei der alkalischen Entsalzung (s. D.7) aus einer Spaltung von XpXpX hervorgehen. Diese Möglichkeit wurde jedoch durch Monophosphoesterase-Behandlung, die nicht das entsprechende dephosphorylierte Produkt enthält, widerlegt.

Durch Exonuklease-Behandlung bleiben die Nukleotide unverändert und aus XpXpX entstehen 2 Nukleotide pro Nukleosid. Aus diesen Betrachtungen wurden die Prozentsätze jedes Peaks berechnet. Nach Umrechnung ergibt sich für die Mononukleotide 5,8 % und für die Trinukleotide 94,2 %. Um dies weiter zu prüfen, wurde eine Monophosphoesterase-Behandlung eines 2. Aliquotes des Peaks II 2 vorgenommen. Wie erwartet, ergab die Rechromatographie von 10 OD 271 im selben System zwei Peaks (s. Abb. 7).

Der kleine Peak II 2b' ist einem Rest von nicht dephosphoryliertem Nukleotid zuzuteilen. Dies wurde bei der Berechnung berücksichtigt. Aus diesen Berechnungen ergibt sich, daß der Peak II 2a' 5,6 % und der Peak II 2b'' 94,4 % enthält. Dies stimmt vollkommen mit dem obigen Resultat überein. Außerdem betrug das Verhältnis

$$\frac{\text{OD 271 Nukleoside} + \text{OD 271 Nukleotide}}{\text{OD 271 Nukleoside}}$$

für den Peak II 2b'' 3,11 (s. Abb. 8). Man kann weiter feststellen, daß im Bereich 0,11 - 0,12 m NaCl kein Peak auftritt, was eine Spaltung von XpXpX unwahrscheinlich macht.

C.4 Rechromatographie des Peak III

Abb. 9 zeigt die Rechromatographie zweier Aliquote des Peak III nach Entsalzung; oben (Abb. 9a) eine Kontrolle, d.h. ohne weitere Behandlung, unten (Abb. 9b) nach Monophosphoesterase-Behandlung. Die ersten Peaks entsprechen ihrer Elutionsordnung nach XpX. Dies wurde durch Exonuklease-Verdauung bestätigt. Das zweite Aliquot zeigte nach enzymatischer Dephosphorylierung eine XpX-Zunahme (Peak III 1 P) mit entsprechender Abnahme des zweiten Peak (III 2 P). Das Verhältnis

$$\frac{\text{OD 271 Nukleoside} + \text{OD 271 Nukleotide}}{\text{OD 271 Nukleoside}}$$

betrug für diesen letzten Peak 3,82. Dieser Wert entspricht einem dihydroxylierten Tetranukleotid mit 3' Ladungen. Die prozentuale Zusammensetzung der jeweiligen Fraktionen ist in Tab. 2 zusammengefaßt.

Um die Anwesenheit der neuerscheinenden Dinukleotide erklären zu können, berücksichtigten wir die Tab. 3. In der ersten Spalte links steht die der Ladung III entsprechende virtuelle Zusammensetzung des Peak III nach

Bestrahlung. Dabei stellt R einen oxydierten Zucker oder ein Nukleosid mit oxydiertem Zucker dar. Die folgenden Spalten entsprechen den dephosphorylierten Produkten bzw. Spaltungsprodukten, die durch die in Abschnitt A.3 erwähnten Mechanismen der alkalischen Degradierung zu erwarten sind. Diese Veränderungen können durch die lang andauernde alkalische Entsalzung bei pH 8,4 verursacht sein. Unterstrichen sind die Abbauprodukte, die tatsächlich beobachtet wurden. Da experimentell nur Verbindungen mit 1 und 3 Ladungen gefunden wurden, ist wahrscheinlich, daß unter diesen schonenden Bedingungen der Mechanismus der Zyklisierung (A.7) nicht in Frage kommt. Außerdem spricht die Tatsache, daß der experimentelle Wert des Verhältnisses

OD 271 Nukleoside + OD 271 Nukleotide

OD 271 Nukleoside

für die gefundenen Tetranukleotide (3,82) dem theoretischen Wert (4) sehr nahe liegt, mehr für den Mechanismus 2 der β -Eliminierung (Tab. 3), d.h. für R = Nukleoside mit oxydiertem Zucker als für den Mechanismus 1, welcher Basen-Freisetzung mit einbezieht.

Wie Tab. 2 ergibt, enthält nach andauernder alkalischer Inkubation bei pH 8,4 Peak III 63,5 % dihydroxylierte Tetranukleotide und 25,5 % neugebildete dihydroxylierte Dinukleotide. 11 % (74,5 - 63,5) der in Peak III enthaltenen Verbindungen bleiben phosphoryliert. Ob diese dihydroxylierten Dinukleotide durch Freisetzung labilen Phosphats oder durch weitere Spaltung der dihydroxylierten Tetranukleotide entstehen, kann nicht direkt entschieden werden. Es ist indessen wahrscheinlich, daß der Dephosphorylierungs-Prozeß entscheidend ist: Nimmt man nämlich an, daß die 25,5 % dihydroxylierten Dinukleotide aus einer Spaltung von $XpXpXpX$ zu $XpX + pXpX$ (1 und 3 Ladungen) entstanden sind, so müßte nach Monophosphoesterasebehandlung noch der gleiche Anteil zusätzlich mit nur

1 Ladung erscheinen ($pXpX \longrightarrow XpX + p$), also insgesamt 51 % im ersten Peak erscheinen. Da aber die Steigerung im Peak I nach Monophosphoesterasebehandlung nur 11 % beträgt, ergibt sich, daß zumindest 14,5 % ($25,5 - 11$) aus einer Abspaltung einer labilen Phosphatgruppe ($XpX^*p \longrightarrow XpX^* + p$) entstanden sind. Höchstens 11 % von XpX könnte aus einer Alkalisplaltung von $XpXpXpX$ entstanden sein, obwohl man dann annehmen müßte, daß vor der Alkalibehandlung kein $XpXp$ mit stabilem endständigem Phosphat vorhanden ist, was wenig wahrscheinlich ist.

C.5 Rechromatographie des Peak IV nach Alkalibehandlung

Die Untersuchungen mit Peak III hatten gezeigt, daß bei der Rechromatographie, bei der eine alkalische Behandlung während der Entsalzung nicht zu vermeiden ist, neue stabile Produkte entstehen, die dann im einzelnen analysiert werden können. Es erschien deshalb sinnvoll, vor der Rechromatographie eine längere Behandlung unter Alkali nach Weiss (1964) durchzuführen, um eine vollständige Freisetzung der labilen Phosphate zu erreichen bzw. alle labilen Bindungen zu spalten. Ein Aliquot des Peak IV wurde in 1 m NH_4OH 30 min bei 37 °C inkubiert. Aus dem entstandenen Chromatogramm (Abb. 10a) ist ersichtlich, daß jedes Glied von null bis fünf Ladungen vorhanden ist. Da nach Bestrahlung der Peak IV nur Bestandteile mit 4 Ladungen enthalten konnte, nämlich eventuell dihydroxylierte Pentanukleotide, monophosphorylierte Tetranukleotide und diphosphorylierte Nukleoside, sind wenigstens die Verbindungen mit ein, drei und fünf Ladungen auf Alkali-bedingte Spaltungen zurückzuführen, während auch teilweise die Verbindungen mit der Ladung null, eins und zwei aus labilen Phosphat-Freisetzen entstehen können.

Um diese Beobachtung präzisieren zu können, wurde auf ähnliche Weise wie für Tab. 3 die Tab.4 aufgestellt. Sie zeigt die durch Bestrahlung virtuelle Zusammensetzung

des Peak IV sowie die Veränderungen der Bestandteile des Peak nach Alkali-Behandlung, welche nach den in A.3 erwähnten Mechanismen erwartet werden können. Aus dieser Tabelle geht hervor, daß hydroxylierte sowie phosphorylierte Produkte gebildet werden können. Es ist auch bemerkenswert, daß alle fünf experimentell festgestellten Ladungen in dieses Schema eingeordnet werden können. Außerdem läßt die Tab. 4 auf die virtuelle Zusammensetzung der in Tab. 5a dargestellten Peaks schließen. Um das Verhältnis der phosphorylierten zu den hydroxylierten Abbauprodukten festzustellen, wurde ein zweites Aliquot des Peak IV unter denselben Bedingungen im alkalischen Medium inkubiert, entsalzt (AG 11 A 8 Harz, s. E.7), danach durch Monophosphoesterase-Behandlung dephosphoryliert und anschließend auf gleiche Weise wie das erste Aliquot chromatographisch getrennt. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abb. 10b dargestellt und die prozentuale Zusammensetzung in Tab. 5 angegeben. Weitere Aussagen wurden durch Rechromatographie des Peak IV 4 erhalten, nachdem vorher die endständigen Phosphatgruppen mit Monophosphoesterase entfernt wurden.

Abb. 11 zeigt das entstandene Chromatogramm, während Tab. 5c die entsprechende virtuelle Zusammensetzung zeigt. Aus der Anwesenheit der 3 Peaks ist zu schließen, daß Peak IV 4 alle drei möglichen Oligonukleotid-Arten enthält, also dihydroxylierte, mono- und diphosphorylierte. Weil die Ausbeute in jedem Peak zu gering war, konnte eine präzisere Angabe über die Zusammensetzung dieser Peaks nicht direkt erhalten werden. Wenn jedoch alle Ergebnisse der drei zuletzt geschilderten Chromatographien berücksichtigt werden, ist es möglich, auf direkte Weise in den einzelnen Peaks die Prozentsätze der hydroxylierten und der phosphorylierten Produkte annähernd zu bestimmen.

Um die Umrechnung zu vereinfachen, wurden in folgenden Gleichungen die in Tab. 5a angegebenen Symbole verwandt. Aus Tab. 5a sind folgende Gleichungen zu bilden:

$$\begin{aligned} a &= N = 6,75 \\ b &= D = 0,94 \\ c &= T + Np = 1,45 \\ d &= Te + Dp = 9,3 \\ e &= P + Tp + Np \cdot 2 = 80,2 \\ f &= Tep + Dp \cdot 2 = 1,39 \end{aligned}$$

Aus der Tatsache, daß durch Monophosphoesterase-Behandlung die phosphorylierten Nukleotide zwei Ladungen verlieren, während die diphosphorylierten Nukleoside vier Ladungen verlieren, sind Tab. 5b zufolge folgende Gleichungen aufzustellen:

$$\begin{aligned} a' &= N + Np + Np \cdot 2 = 11,4 \\ b' &= D + Dp + Dp \cdot 2 = 3,0 \\ c' &= T + Tp = 6,3 \\ d' &= Tep + Te = 8,1 \\ e' &= P = 71,2 \end{aligned}$$

Desgleichen lassen sich aus Tab. 5c die folgenden Prozentsätze direkt ablesen:

$$\begin{aligned} a'' &= Np \cdot 2 = 4,26 \\ b'' &= Tp = 5,49 \\ c'' &= P = 70,5 \end{aligned}$$

Wir können zunächst das nahe Beieinanderliegen der zwei auf verschiedene Weise gewonnenen Werte $c' = 71,2$ und $c'' = 70,5$ (Prozentsatz an hydroxyliertem Pentanukleotid) einerseits und $a'' + b'' = 9,75$ und $e - c' = 9$ (Prozentsatz an Trinukleotidphosphat plus Nukleosiddiphosphat: $Tp + Np \cdot 2$) andererseits feststellen.

Aus c' ergibt sich: $T = 6,3 - Tp = 6,3 - 5,49 = 0,81$

Aus c ergibt sich ebenso:

$$Np = 1,45 - T = 1,45 - 0,81 = 0,64.$$

Aus b' bilden wir:

$$D_p + D_{p2} = 3,0 - 0,94 = 2,06 \quad (1)$$

Außerdem ist d und f zufolge::

$$d = T_e + D_p = 9,3 \quad (2)$$

$$f = T_{ep} + D_{p2} = 1,39 \quad (3)$$

Da T_{ep} und D_{p2} uns nicht bekannt sind, können D_p und T_e auf die nachfolgende Weise nur annähernd bestimmt werden:

Wir nehmen zunächst an, daß $D_{p2} = 0$ sei. Aus (1) ergibt sich dann $D_p = 2,06$, während sich aus (3) $T_{ep} = 1,39$ ergibt, also wäre (nach (2)) $T_e = 9,3 - 2,06 = 7,24$.

Nehmen wir an, daß $T_{ep} = 0$ sei, so folgt daraus:

$$D_{p2} = 1,39 \quad D_p = 2,06 - 1,39 = 0,68$$

und

$$T_e = 9,3 - 0,68 = 8,62$$

Um diesen letzten Punkt zusammenzufassen, haben wir aus den Annäherungen

$$T_{ep} \approx 1,39$$

$$D_{p2} \approx 1,39$$

folgendes geschlossen:

$$0,68 < D_p < 2,06$$

$$7,14 < T_e < 8,62$$

Die hier gewonnenen Werte sind in Tab. 5a übertragen.

Aus den Ergebnissen dieser drei Chromatographien (Tab. 5a, b, c) ist zu schließen, daß mindestens 19,8 % der gesamten in Peak IV eluierten Extinktion bei 271 m μ nach Alkali-Behandlung in andere Verbindungen umgewandelt werden. Zusätzlich könnten innere Transformationen im Peak IV 4 etwa $X_p X_p X_p X_p (4) \longrightarrow X_p X_p X_p (4) + X_p X (1)$ stattgefunden haben.

Wenn wir also berücksichtigen, daß die 6,75 % beobachtete Nukleotide nur mit entsprechender Bildung von phosphorylierten Oligonukleotiden mit 5 Ladungen (1,39 %) und Zykloligoligonukleotiden mit 4 Ladungen (s. Tab. 4) entstehen können, kommen wir zu dem Schluß, daß Peak IV 4 6,75 - 1,39 = 5,36 % Zykloligoligonukleotide enthält. Deren Anwesenheit vermuten wir, nachdem die Phosphodiesterase-Aufspaltung des Peak IV 4'4 (Abb. 11) uns nicht gelungen ist. Auch bei der Chromatographie des Hydrolysats über DEAE Cellulose (s. E.6.2) hinterließ der mit 1 n Acetat eluierte zweite Peak sogar nach verlängerten enzymatischen Inkubationszeiten einen Schwanz (vergl. Abb. 8). Um die Existenz von Zykloligoligonukleotiden nachzuweisen, wäre es jedoch nötig, größere Mengen an Produkten mit vier Ladungen zu gewinnen.

Diese Versuche haben uns gelehrt, daß durch Alkali-Degradierung aus der Ladung vier 18,44 % Verbindungen mit niedrigerer Ladung entstehen. Es war deshalb interessant festzustellen, ob diese Alkali-Degradierung auch für die größeren Glieder besteht. Unsere folgenden Versuche sind darauf ausgerichtet, dazu weitere Aussagen zu liefern.

C.6 Chromatographie einer bestrahlten DNS-Lösung nach Alkali-Behandlung

Eine wässrige DNS-Lösung ($0,5 \text{ mg ml}^{-1}$) wurde mit 400 KR bestrahlt, dann gleich nach der Bestrahlung mit 1 m NH_4OH 30 min. bei 37°C inkubiert, entsalzt (AG 11 A 8 Harz) und anschließend auf eine DEAE-Sephadex-Säule aufgetragen. Diese Versuche wurden - abgesehen von der Alkali-Behandlung - genau wie im Teil C beschrieben, bis zu Ladung IV durchgeführt. Das entstandene Chromatogramm ließ sich so mit dem in Abb. 3 gezeigten vergleichen. Wir müssen hierbei auf den Unterschied zwischen dem im Teil C beschriebenen und dem hier vorliegenden letzten Versuch achten. Während bei dem ersten Versuch die einzelnen Peaks die Alkali-stabilen und die

labilisierten Bestrahlungsprodukte enthielten, enthalten sie bei dieser letzten Trennung die Alkali-stabilen Bestrahlungsprodukte sowie die durch Alkali-Degradierung entstandenen Abbauprodukte. Aus dem vorhergegangenen Versuch (s. C.5) läßt sich voraussehen, daß die Menge der in den einzelnen Peaks erhaltenen Oligonukleotide zunimmt. Diese Zunahme kann einmal für einen bestimmten Peak aus der Nukleosid-Freisetzung der Oligonukleotide des vorhergehenden Peak mit entsprechendem Gewinn einer Ladung resultieren oder aus Spaltungen bzw. Dephosphorylierung von Oligonukleotiden - den größeren Ladungen entsprechend - im nachfolgenden Peak.

Ein Vergleich der entsprechenden Peaks bei gleichen Versuchen ($400 \text{ KR } 0,5 \text{ mg ml}^{-1}$) einmal vor und einmal nach einer Alkali-Vorinkubation (s. Teil C) ist in Abb. 12 dargestellt. Aus dieser Abbildung ergibt sich, daß die Ausbeute an Basen von der Alkali-Behandlung unabhängig zu sein scheint. Ihre Anwesenheit ist offenbar auf eine spontane Freisetzung durch die Bestrahlung selbst zurückzuführen. Dagegen steigt die Menge an Nukleosiden nach der Alkalibehandlung bis fast auf das Doppelte an. Es hat somit den Anschein, daß die durch Alkali-Inkubation entstandenen Produkte bevorzugt an dem Ende der Polynukleotide abgespalten werden, d.h. als ob die durch Bestrahlung veränderten und auf Alkali labilen Zucker an oder neben dem Bruchende liegen würden.

Die Verbindungen mit 1, 2, 3 und 4 Ladungen nehmen ebenso etwas zu, wobei die absolute Zunahme bei den Peaks mit 4 Ladungen am größten ist. Diese Zunahme ist verständlich, wenn man berücksichtigt, daß bei einer Phosphatabspaltung, bei der dihydroxylierte Nukleotide entstehen, jeweils 2 Ladungen verloren gehen; die Verbindungen mit höheren Ladungen werden also in Verbindungen niedriger umgewandelt. Ebenso ist es möglich, daß bei der Alkali-Behandlung ein Oligonukleotid gespalten wird und in Verbindungen

mit niedriger Ladung zerfällt. Wie wir früher am Beispiel des Peak III (C.4, Tab. III) zeigten, sind jedoch Spaltungen in der Mitte der Kette weniger wahrscheinlich als eine Freisetzung von Monomeren am Ende des Oligonukleotids.

Um hierzu noch detailliertere Aussagen zu machen, wurde Peak IV' im folgenden (C.6.2) näher analysiert. Voraussetzung war jedoch, daß die Position des Peak IV' auch tatsächlich unter diesen Bedingungen 4 Ladungen entsprach. Dies ergibt sich wohl nach der Elutionsordnung, es war jedoch zuvor notwendig, die Identität des in den verschiedenen Chromatogrammen auftretenden Peak O mit den Nukleosiden und den freien Basen zu beweisen.

C.6.1 Chromatographische Trennung der Basen und Nukleoside (Peak O)

Zunächst wurden die Basen und Nukleoside über eine Dowex 50 x 8 (H⁺-Form)-Säule (siehe C.1) voneinander getrennt. Dabei erhält man auch das in Abb. 12 angegebene Verhältnis von Basen und Nukleotiden. Jede Fraktion wurde dann weiter analysiert. Die Basen wurden in 6 ml 2 n HCl auf eine 1,35 x 18 cm Dowex 50 x 8 (H⁺-Form)-Säule aufgetragen. Dann mit 2 n HCl eluiert (Cohn 1961). Das Chromatogramm zeigt Abb. 13. Die entsalzten Nukleoside wurden, wie von Georgatos und Laskowski (1962) beschrieben, getrennt und bestimmt. Allerdings wurde mit dem Austauscher Dowex 1 x 8 (Acetat-Form) gearbeitet, statt mit Dowex 1 x 2. Etwa 7 ml Mischung wurden auf eine 1,35 x 14 cm Säule aufgetragen. Die Säule wurde zuerst mit Wasser gewaschen (Abb. 14). Statt der erwarteten Trennung von Desoxycytidin (dC) und Desoxyadenosin (dA) wurde nur ein Peak mit einem breiten Schwanz erhalten. Die Säule wurde weiter mit 0,1 n Ammoniumacetat pH 6,2 eluiert. Abgesehen von den Peaks, die Thymidin (dT) und Desoxyguanosin (dG) entsprechen, wurden zwei abnorme Peaks beobachtet, die den von Thymidin einrahmen, dX und dJ genannt. Da es möglich war,

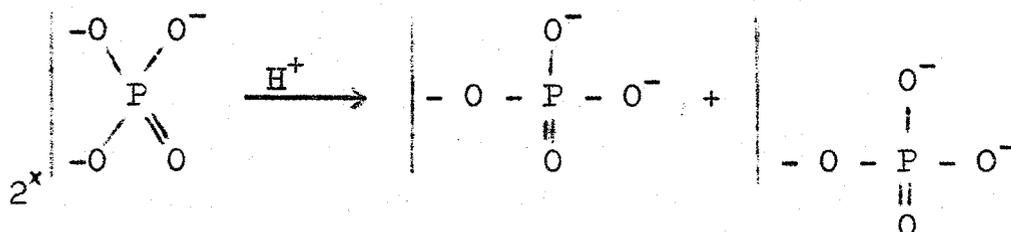
daß sich dC und dA deshalb nicht getrennt hatten, weil die Entsalzung unvollständig war, wurde der entsprechende Peak von neuem auf einer AG 11 A 8-Harz-Säule entsalzt, wieder auf dieselbe Dowex 1 x 8 - Säule aufgetragen und anschließend mit einer kleineren Durchflußrate eluiert (Abb. 15).

Die verschiedenen Basen und Nukleoside wurden durch ihre Elutionsordnung nach ihren Verhältnissen $E_{250 \text{ m}\mu} / E_{260 \text{ m}\mu}$, $E_{280 \text{ m}\mu} / E_{260 \text{ m}\mu}$, $E_{290 \text{ m}\mu} / E_{260 \text{ m}\mu}$ identifiziert und ihr Betrag nach ihrem Molekularextinktionskoeffizienten (Beaven und Holiday, 1955, Harbers 1964) berechnet. dJ wurde nach seiner bei $250 \text{ m}\mu$ liegenden maximalen Extinktion und seinem Spektrum nach als Desoxyinosin identifiziert. Die prozentuale Zusammensetzung zeigt die Tabelle 6. Ein Vergleich zwischen den ohne Alkali-Vorinkubation und den nach Inkubation erhaltenen Nukleosiden hätte Aussagen über die Natur der durch Alkali freigesetzten Nukleoside gegeben. Die Nukleosidfraktion ohne Alkalibehandlung der DNS ging aber leider durch Spülmittel-Verunreinigung des Glasgefäßes verloren.

C.6.2 Rechromatographie des Peak IV

Wie schon erwähnt, führt die Inkubation der bestrahlten DNS mit Alkali vor der Chromatographie über DEAE-Sephadex zu einer Erhöhung um 37 % der Gesamt-OD 271 des Peak IV' im Verhältnis zum Peak IV ohne diese Alkali-Vorinkubation. Es ist zunächst berechtigt anzunehmen, daß die Bestandteile des Peak IV' denen des Peak IV, die in Tab. 5 dargestellt sind, entsprechen, ihre Zusammensetzung mag jedoch verschieden sein. Bei dem Peak IV' können nämlich die verschiedenen Bestandteile aus Nachbarn, namentlich aus denen, die größere Ladungen enthalten, entstanden sein. Wenn endständige Cyclophosphate vorhanden sind, bleiben ihre Strukturen (Rushizky u.a. 1964) unter unseren Chromatographie- und Entsalzungsbedingungen erhalten. Um die Existenz von Cyclophosphaten zu beweisen, wurde Peak IV'

vor der Entsalzung 5 min. bei 100 °C mit 0,1 n HCl inkubiert (Tener u.a. 1958). Damit werden die endständigen Cyclophosphate zu den entsprechenden sekundären Phosphatgruppen hydrolysiert. Es wird dabei eine zusätzliche Ladung gebildet, wie es sich aus folgendem Schema ergibt:



Peak IV' wurde nun nach einer solchen Säure-Behandlung und nach Entsalzung auf eine DEAE-Sephadex-Säule aufgetragen und mit 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris, pH 7,6 vorgewaschen. Es wurden dabei keine Basen eluiert. Die Säule wurde dann mit einem linearen NaCl-Gradienten in 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris, pH 7,6 eluiert. Aus dem entstandenen Chromatogramm (Abb. 16) ist ein Peak (IV'5) zu ersehen, dessen Bestandteile mit 5 Ladungen vermutlich aus den endständigen Cyclophosphaten hervorgegangen sind. Die virtuelle Zusammensetzung aller dieser Peaks ist in Tab. 7a gezeigt. Die Prozentsätze sind auf 80,2 bezogen, d.h. auf die Menge von Peak IV,4 (Tab. 5a), um Peak IV und IV' vergleichbar zu machen. Um sich zu vergewissern, daß kein Cyclophosphat in dem Peak IV'4 verblieb, wurde ein kleines Aliquot dieses Peak auf gleiche Weise behandelt und chromatographiert. Es ergab sich, daß die Hydrolyse der Cyclophosphate vollständig war, da ein einziger Peak eluiert wurde; auch hier wurde keine Base eluiert.

3' → 5' und 2'5' Nukleosid-Cyclophosphate wurden - ohne Basenverlust - von Smith u.a. (1958) und Michelson (1958) synthetisiert. Unter den oben erwähnten sauren Bedingungen werden die Cyclophosphate zur sekundären Phosphatgruppe hydrolysiert und dabei auch die Pyrimidin-Basen - deren säureresistente Bindungen durch Zyklisierung labilisiert

wurden - freigesetzt (Tener u.a. 1958), nicht nur die Purinbasen. Da bei unseren Versuchen der Säurehydrolyse jedoch keine Basen freigesetzt wurden, ist es anzunehmen, daß die vorliegende Zyklisierung hauptsächlich auf den in Abschnitt A.4 erwähnten Mechanismus (Schema A₇) (Bayley u.a. 1961) zurückzuführen ist, wobei die Base bereits zuvor abgespalten war (in Tab. 7a mit R* bezeichnet).

C.6.2.1 Rechromatographie des Peak IV'5

Um zu prüfen, ob die in der letzten Spalte der Tab. 7a vorausgesetzte Zusammensetzung des Peak. IV'5 richtig ist, wurde dieser Peak durch Monophosphoesterase dephosphoryliert, auf eine DEAE-Sephadex-Säule aufgetragen und mit einem linearen NaCl-Gradienten in 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris, pH 7,6 eluiert. Das entstandene Chromatogramm (Abb. 17) steht in vollem Einklang mit der obigen Annahme. Die entsprechende Zusammensetzung des Peak IV'5,1 und IV'5,3 ist in Tab. 7b gezeigt, wobei hier R* als Zucker in Aldehyd-Form, d.h. ohne Base, anzunehmen ist. Der entsprechende Verlust an UV-Absorption wurde für die Berechnung der Prozentsätze - die in derselben Tabelle angegeben sind - berücksichtigt. Freilich wäre es wichtig gewesen, die Abwesenheit von endständigen Basen durch Analyse des Phosphodiesterase-Hydrolysats weiter zu prüfen. Solche Versuche waren jedoch nicht möglich, weil die Ausbeute an einzelnen Peaks zu gering war.

C.6.2.2 Rechromatographie des Peak IV'4

Da die Ausbeute an Peak IV'4 ausreichend war, wurde dieser Peak nach Monophosphoesterase-Behandlung auf eine DEAE-Sephadex-Säule aufgetragen und auf übliche Weise (NaCl-Gradient, 7 m Harnstoff, pH 7,6) getrennt. Wenn unsere Annahme für die in Tab. 7a angegebene virtuelle Zusammensetzung richtig ist, sind aus dieser Auftrennung drei

Peaks mit Ladung 0,2 und 4 zu erwarten. Aus Abb. 18 geht hervor, daß die experimentellen Ergebnisse mit unserer Annahme in vollem Einklang stehen. Die entsprechenden Zusammensetzungen sind in Tab. 7c angegeben, wobei die Prozentsätze auf 71,06 % bezogen sind.

C.6.2.3 Kettenlängen-Bestimmung des Peak. IV'4-4

Nach Entsalzung wurde der Peak IV'4-4 mit Exonuklease B zu Mononukleotiden und Nukleosiden hydrolysiert (s. E.2) und auf eine kurze DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen. Die Nukleoside wurden mit Wasser eluiert und dann die Nukleotide mit 0,3 n Ammoniumacetat eluiert. Kein weiteres UV-absorbierendes Material wurde mit 1 n Acetat eluiert. Das Verhältnis

$$\frac{\text{OD 271 Nukleoside} + \text{OD 271 Nukleotide}}{\text{OD 271 Nukleoside}}$$

betrug 4,75, was dem theoretischen Wert (5) für Pentanukleotide sehr nahe liegt. Dieser Befund läßt darauf schließen, daß bei diesen Verbindungen die endständigen Basen nur wenig verändert werden.

Ein Blick auf die Tab. 8, die einen Vergleich zwischen der prozentualen Zusammensetzung des Peak IV 4 und IV' liefert, zeigt uns eine relativ starke Zunahme der phosphorylierten Produkte auf Kosten der hydroxylierten Produkte, was unsere anfangs (s. C.6) erläuterte Vorstellung bestätigt, nämlich, daß diese phosphorylierten Produkte wesentlich aus einer Alkalisplaltung von endständigen hydroxylierten Gruppen entstehen. Geht man davon aus, daß Peak IV' 37 % mehr absorbierende Substanzen enthält als Peak IV 4, so folgt daraus, daß die Erhöhung an phosphorylierten Produkten mit 4 Ladungen - zyklische Produkte einbegriffen - 26 bis 27 % und die der hydroxylierten Produkte 10 bis 11 % betrug. Dieser Betrag von 11 % entspricht etwa der Entstehung von IV 3 bei der Rechromatographie von IV auf Kosten von IV 4 (7,24 bis 8,62 %; Tab. 5a).

C.7 Untersuchungen über die Alkalilabilität von bestrahlter hochmolekularer DNS

Die Untersuchungen an den durch Bestrahlung entstandenen Oligonukleotiden hatten gezeigt, daß ihre Endgruppen durch Alkalibehandlung erheblich verändert werden. Dagegen hatte es den Anschein, daß Spaltungen der Nukleotidkette nach Alkalibehandlung nicht auftreten. Es war zu prüfen, ob dies auch für hochmolekulare DNS gilt, bei der eine Bestrahlung nur wenige Brüche induziert hat.

Ein Hinweis auf Phosphatgruppen an den Bruchenden gibt die von Collins u.a. (1964) verwendete Inkubation mit Monophosphoesterase. Inkubiert man unbestrahlte DNS-Lösungen mit einer gereinigten alkalischen Phosphatase (siehe E.2) bei pH 8,2 und 37 °C, so wird - sogar nach verlängerten Inkubationszeiten - sehr wenig Phosphat abgespalten. Verwendet man bestrahlte DNS, so läßt sich mehr Phosphat freisetzen. Nach 48 Stunden wird ein maximaler Wert erreicht, der - entsprechend den phosphorylierten Enden pro Volumeneinheit - von der verabreichten Strahlendosis abhängig ist. Aus Abb. 19 ist zu ersehen, daß ohne Enzym an der bestrahlten sowie an der unbestrahlten DNS nur eine schwache Phosphat-Freisetzung stattfindet. Gibt man indessen nach einer Inkubation von 76 Stunden bei pH 8,2 Enzym hinzu, so wird von der bestrahlten DNS rasch Phosphat freigesetzt, und zwar fast zwei mal so schnell als ohne vorherige Inkubation bei pH 8,2. Eine zweite Zugabe von alkalischer Phosphatase 76 Stunden nach der ersten hatte dagegen an der bestrahlten DNS nur eine geringe Erhöhung des freien Phosphats zur Folge.

Aus der größeren Anfangsgeschwindigkeit nach einer Vorinkubation im alkalischen Medium geht hervor, daß die Substratkonzentration - nämlich die phosphorylierten Enden - größer geworden ist. Wie übrigens in A.2 (Abb. 1) schon erwähnt, steigt die säurelösliche Fraktion bestrahlter DNS nach einer alkalischen Vorinkubation bei gleichen Bedingungen an, was besagt, daß Oligonukleotide freigesetzt wurden.

Deshalb war sorgfältig zu prüfen, ob während der langen Inkubationen der DNS mit der alkalischen Phosphatase nicht andere chemische oder enzymatische Reaktionen ablaufen.

Da denaturierte DNS bei längeren Inkubationszeiten hydrolysiert (J. Eigner u.a. 1961), verhinderten wir eine mögliche Denaturierung durch Zugabe von NaCl bis zu einer Endkonzentration von 1 m. Was die enzymatischen Reaktionen betrifft, prüften wir die Abwesenheit von Verunreinigungen an Endonuklease oder Exonuklease (Phosphodiesterase) in unserem Phosphatasepräparat. Diese Enzyme würden nämlich zusätzliche Phosphatendgruppen und säurelösliches Material erzeugen. Die Abwesenheit einer Endonuklease-Aktivität bei der Inkubation konnte durch die Bestimmung der Viskosität der inkubierten DNS-Proben erschlossen werden. Unbestrahlte DNS ($M_n \approx 10^7$) verliert ihre Viskosität auch nach einer Inkubation von 96 Stunden nicht, und zwar mit oder ohne Anwesenheit von $0,025 \text{ mg ml}^{-1}$ alkalischer Phosphatase (Tab. 9). Inkubiert man bestrahlte DNS, so ist ebenfalls keine signifikante Abnahme der Viskosität festzustellen, sei es mit oder ohne Phosphatase. Entsprechend der verabreichten Strahlendosis ist die Ausgangsviskosität natürlich geringer.

Eine mögliche Verunreinigung an Exonuklease prüften wir, indem wir zu einem Ansatz mit alkalischer Phosphatase noch zusätzlich Schlangengift-Phosphodiesterase hinzugaben (Tab. 10). Es wird mit $0,010 \text{ mg}$ Enzym innerhalb von 48 Stunden kein Phosphat abgespalten. Gibt man $0,010 \text{ mg}$ Phosphodiesterase zu $0,1 \text{ mg}$ alkalischer Phosphatase und inkubiert man damit die DNS, so wird zwar deutlich mehr Phosphat abgespalten, der Anstieg ist aber nicht so groß als daß angenommen werden kann, an der Phosphatabspaltung durch unser Enzympräparat sind Verunreinigungen an Phosphodiesterase beteiligt.

Als weiteres Kriterium für die Anwesenheit von Phosphodiesterase kann der Anteil von säurelöslichen Nukleotiden nach der Inkubation verwendet werden. Wie Tab. 10 unten zeigt, wird zwar bei bestrahlter wie bei unbestrahlter DNA während der Inkubation säurelösliches, UV-absorbierendes Material freigegeben (vgl. auch Abb. 1), die Anwesenheit von Phosphatase erhöht aber diesen Anteil nicht wesentlich. Diese Versuche lassen eine Verunreinigung an einer Exonuklease in der alkalischen Phosphatase ausschließen. Sie zeigen zudem folgendes: 1) Die verwendeten DNS-Präparate sind bei einer alkalischen Inkubation nicht stabil. 2) Entsprechend den Viskositätsmessungen, verändert sich die Kettenlänge der Polynukleotide nicht, und zwar nicht nur bei der unbestrahlten DNS, sondern auch bei der bestrahlten DNS. 3) Bei der Inkubation der DNS im alkalischen Medium wird jedoch säurelösliches Material abgegeben. Dabei scheint es sich nicht um phosphorylierte Abbauprodukte zu handeln, da sonst ein entsprechender Anteil von freiem Phosphat erscheinen müßte.

Aus diesen Feststellungen läßt sich die Zeitkurve der Phosphatfreisetzung (Abb. 19) dadurch interpretieren, daß bei der Vorinkubation kurze hydroxylierte Produkte von den Bruchenden her abgespalten werden und dann eine endständige Phosphatgruppe vorliegt, während bei der Inkubation mit Phosphatase bei pH 8,2 beide Prozesse gleichzeitig vor sich gehen.

D. Diskussion

Die Versuche waren darauf ausgerichtet, die chemischen Reaktionen zu beschreiben, die in der DNS nach Einwirkung von ionisierenden Strahlen Brüche in der Nukleotidkette hervorrufen. Vorzugsweise wurden diese Untersuchungen an DNS vorgenommen, die so hoch bestrahlt wurde, daß die mittlere Kettenlänge nur etwa 10 - 20 betrug. Die entstandenen Oligonukleotide konnten dann mit geeigneten Chromatographiever-

fahren getrennt werden und mit enzymatischen und chemischen Methoden charakterisiert werden. Wie durch frühere Untersuchungen von Weiss (1964) zu vermuten war, ergaben die ersten Untersuchungen, daß ein Teil der erhaltenen Oligonukleotide im alkalischen Medium nicht stabil war. Es war deshalb von vornherein zwischen den alkalistabilen Verbindungen und den labilen zu unterscheiden, die sich bei hohen pH-Werten umsetzten. Entsprechend mußten auch Mechanismen diskutiert werden, die zunächst zur Entstehung der Brüche in der bestrahlten DNS führen und ferner diejenigen, die über die Alkalilabilität der entstandenen Verbindungen Auskunft geben können. Zur Ergänzung und zur Stützung der vorgeschlagenen Mechanismen wurden ferner einige Untersuchungen an hochmolekularer DNS mit nur wenigen Brüchen durchgeführt.

D.1 Identifizierung der gefundenen Spaltprodukte in bestrahlter DNS

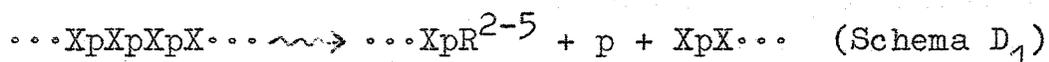
Die in der hochbestrahlten DNS erhaltenen Oligonukleotide wurden zunächst nach der Zahl ihrer Ladungen aufgetrennt und dann weiter mit Phosphomonoesterase auf die Zahl ihrer Phosphatgruppen sowie mit Phosphodiesterase auf ihre Kettenlänge untersucht. Zum Vergleich wurde in ähnlicher Weise eine DNS-Probe fraktioniert, die nach der Bestrahlung mit Alkali behandelt worden war. Es war jedoch nicht möglich, alle Verbindungen im einzelnen zu identifizieren; vielmehr konnten nur kurze Ketten von 2 - 5 Nukleotiden bestimmt werden. Der prozentuale Anteil dieser Oligonukleotide an der Gesamtmenge der DNS ist in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Auffallend ist zunächst, daß 10 % des UV-absorbierenden Materials freie Basen oder Nukleoside sind, dagegen sind Nukleotide kaum zu finden. Die übrigen Verbindungen wurden nach ihrer Kettenlänge geordnet (Tabelle 12). Dabei mußten einige Annahmen über die Menge der phosphorylierten Verbindungen gemacht werden, indem vermutet wurde, daß der Peak mit 5 oder 6 Ladungen (V und VI) ähnlich zusammengesetzt

ist wie der gut untersuchte Peak IV.

Die Menge der Oligonukleotide nimmt mit zunehmender Kettenlänge erwartungsgemäß zu, da bei einer mittleren Kettenlänge von 10 eine statistische Verteilung der verschiedenen Kettenlängen anzunehmen ist. Die dihydroxylierten Verbindungen sind bei der Kettenlänge 3 und 4 die häufigsten (70 - 80 %), die phosphorylierten Verbindungen sind vergleichsweise seltener. Nur bei der Kettenlänge 2 ist das Monophosphat das häufigste Spaltprodukt, nämlich das mit einer Hydroxylgruppe und mit einer Phosphatgruppe. Ferner konnten bei der Kettenlänge 3 und 4 Cyclophosphate nachgewiesen werden.

Die Messungen zeigen, daß die strahlenbedingten Bruchenden in der DNS zu einem großen Teil freie Hydroxylenden tragen. Die Phosphatgruppe wird möglicherweise gleichzeitig abgespalten. Einer der Zucker ist durch die angreifenden Radikale aus dem Wasser oxydiert worden, was durch folgendes Schema verdeutlicht werden kann:



wobei R^{2-5} ein Nukleosid bedeutet, dessen C_2 -, C_3 -, C_4 - oder C_5 -Atom am Zucker oxydiert wurde. Die Phosphatgruppe kann dabei auch an dem anderen Bruchende verbleiben; es wurden ja auch phosphorylierte Bruchenden nachgewiesen. Die Entstehung von Cyclophosphaten soll später noch erörtert werden.

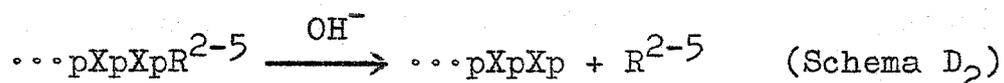
D.2 Alkalilabilität der bestrahlten Oligonukleotide

Einige der erhaltenen Fraktionen wurden mit Alkali behandelt und weiter identifiziert. Insbesondere ließ sich am Peak IV die Alkalilabilität der Bestrahlungsprodukte studieren. Weiter wurde eine DNS-Probe nach der Bestrahlung mit Alkali behandelt und im einzelnen charakterisiert. Beide Untersuchungsmethoden zeigten übereinstimmende Resultate.

tate, die in Tabelle 5a und 11 zusammengefaßt sind. Es ergibt sich:

1. Die Zahl der Nukleoside nimmt deutlich zu.
2. Ebenso nehmen die Verbindungen mit endständigem Phosphat zu.
3. Die Zahl der Cyclophosphate nimmt zu.
4. Die Zahl der freien Basen ändert sich nur wenig; es werden in dem Alkali-behandelten DNS-Ansatz sogar etwas weniger Basen gefunden als in dem unbehandelten, nur bestrahlten Ansatz.
5. Aus den Veränderungen von Peak IV nach Alkalieinwirkung wird auch wahrscheinlich, daß neue hydroxylierte Bruchenden entstehen, offenbar durch Abspaltung von Phosphat nach dem früher besprochenen Mechanismus der β -Eliminierung.

Die Zunahme der Nukleoside und der phosphorylierten Oligonukleotide könnte auf einer β -Eliminierung des in Schema D₁ gezeigten Bruchendes beruhen:

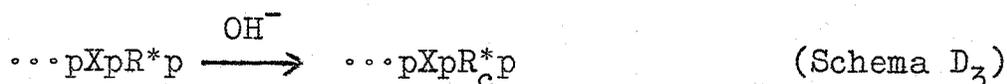


Voraussetzung ist, daß diese Bruchenden oxydierte Gruppen tragen, wobei nicht im einzelnen zwischen einer Oxydation am C₂-, C₃-, C₄- oder C₅-Atom unterschieden werden kann, da unsere Untersuchungen keine Auskunft darüber geben, ob 3'- oder 5'-Hydroxylenden vorliegen. Das abgespaltene Nukleosid müßte dann entsprechend den Vorstellungen bei der β -Eliminierung eine Doppelbindung tragen. Diese Vorstellungen würden auch die Überlegungen von Rhaese und Freese (1968) unterstützen.

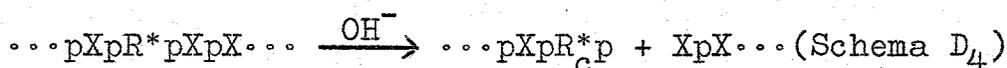
Der Nachweis von Cyclophosphaten, insbesondere nach Alkali-behandlung, läßt jedoch auch den Mechanismus einer Zyklisierung nicht ausschließen (Schema A₇). Spaltet man diese Cyclophosphate mit Säure, so entstehen endständige Phosphate mit einer Ladung mehr. Nukleotidbasen werden unter dieser

Behandlung gleichzeitig abgespalten. Da sich bei unseren Versuchen wohl eine Zunahme von Ladungen ergab, jedoch keine Basen freigesetzt wurden, muß man annehmen, daß die Basen bereits vorher angespalten wurden. Dementsprechend würde sich folgendes Reaktionsschema ergeben:

a) Abspaltung der Base am Ende der Kette:



b) Abspaltung der Base in der Mitte der Kette:



Hierbei bedeutet R^* ein am C_1 -Atom oxydierter Zucker ohne Base.

D.3 Alkalilabilität hochmolekularer DNS

Behandelt man hochmolekulare DNS, die einige Brüche in der Nukleotidkette aufzeigt, unter schonenden Bedingungen mit Alkali, die nicht denaturieren, so ergibt sich folgendes: Es werden mehr endständige Phosphatgruppen gebildet, die sich durch Phosphomonoesterase abspalten lassen. Das unterstützt die zuvor gemachten Beobachtungen, daß nämlich von den Bruchenden her Nukleoside abgespalten werden. Diese konnten dann als säurelösliches Material nachgewiesen werden. Weiter ergab sich, daß die Kettenlänge der bestrahlten DNS bei dieser alkalischen Inkubation unverändert blieb; zumindest wurde keine meßbare Abnahme der Viskosität beobachtet. Allerdings konnte das Auftreten einiger Einzelbrüche nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Genauere Messungen der Bruchraten an einsträngiger bestrahlter DNS nach Alkalibehandlung sind hier noch notwendig. Ebenso wurde auch bei der alkalischen Inkubation von dihydroxylierten Tetranukleotiden kein eindeutiger Hinweis gefunden, daß dabei das Tetranukleotid gespalten wird (vgl. C.4, Tabelle 2).

D.4 Basenabspaltung und Kettenbrüche

Die in der Lösung mit bestrahlter DNS gefundenen Nukleotidbasen werden unmittelbar bei der Bestrahlung freigesetzt; nach einer Alkali-Inkubation findet keine weitere Abspaltung von Basen mehr statt. Dies ist in Übereinstimmung mit den bereits diskutierten Mechanismen. Die Zusammensetzung der abgespaltenen Basen entspricht nicht der in der unbestrahlten Thymus-DNS, vielmehr wird relativ mehr Thymin abgespalten. Ebenso ist auch unter den abgespaltenen Nucleosiden vermehrt Thymidin zu finden. Inwieweit dies im Zusammenhang mit der Tatsache steht, daß auch die Zerstörung des Thymins durch ionisierende Strahlen einen höheren G-Wert hat als die der übrigen Basen (Weiss 1964), kann nicht entschieden werden.

Nach dem Mechanismus der Degradierung von Apurinsäure unter der Einwirkung von Alkali konnte man erwarten, daß eine Abspaltung der Nucleotidbase innerhalb der Nucleotidkette durch Oxydation am C_1 -Atom noch zu keinem Bruch führt. Der Bruch entsteht erst unter der Einwirkung von Alkali. Es war deshalb wichtig festzustellen, ob nach Einwirkung von Alkali auf bestrahlte DNS auch tatsächlich Spaltungen der Nucleotidkette auftreten, und in welchem Verhältnis diese Alkali-bedingten Brüche zu den unmittelbar bei der Bestrahlung entstandenen Brüchen stehen. An unseren Versuchen an hochmolekularer DNS wie auch an Oligonucleotiden findet sich nun kein Anzeichen, daß solche Alkali-bedingten Brüche einen wesentlichen Anteil der Gesamtzahl der Brüche betragen. Dies bedeutet nun aber, daß bei einer Oxydation des C_1 -Atoms, die zu einer Abspaltung der Base führt, auch gleichzeitig ein Bruch der Kette stattfindet, möglicherweise katalysiert durch die bei dem Angriff der beiden OH-Radikale abgegebene Energie (vgl. Schema A₈). Es würden dann Bruchenden mit einem Cyclophosphat ohne Base entstehen - wie auch von uns nachgewiesen wurde - sowie Bruchenden mit einem ungesättigten Aldehyd (Schema A₇):

E.2 Enzym- und Kettenlängen-Bestimmung

Hochgereinigte Monophosphoesterase aus Milz (MPE, 3,7 I U/ml) sowie Exonuklease B(Phosphodiesterase P.D.) wurde freundlicherweise von Dr. Bernardi vom "Centre de Recherche sur les Macromolecules", Strassburg, überlassen.

Die Monophosphoesterase ist eine Phosphoesterase, die die endständigen Phosphate abspaltet, die endständigen Cyclophosphate jedoch unverändert läßt. Die Exonuklease ist eine Phosphodiesterase. Sie katalysiert schrittweise die Hydrolyse der Phospholier-Bindungen zwischen dem Phosphat und dem C₅-Atom des Zuckers vom 5-OH-Ende her. Pro Einzelkette erhält man dann ein Gemisch aus 3'-Phosphat-Nukleosiden und einem Nukleosid, die über eine DEAE-Cellulose-Säule (S.E. 6.2.) getrennt werden. Es wird das Verhältnis

$$\frac{\text{OD 271 Nukleoside} + \text{OD 271 Nukleotide}}{\text{OD 271 Nukleoside}}$$

berechnet, dessen numerischer Wert der Kettenlänge entspricht. In einem solchen Verfahren ist sorgfältig zu prüfen, ob während der Hydrolyse die Zahl der Nukleotide konstant bleibt, d.h. daß keine Verunreinigung der Enzym-Präparation an Phosphatase anwesend ist. Diese konnte ausgeschlossen werden, da unter den unten aufgezeichneten Bedingungen weder eine Verlängerung der Inkubationszeit noch ein Zusatz an Enzym zu einer Abnahme des Verhältnisses führt.

Der verwendete Versuchsansatz und die Inkubationszeit waren für 8 OD 271 Oligonukleotide in 1 ml 0,05 m Ammoniumacetat, pH 5,35, bei 37 °C

- 1) 4 µl M.P.E., 8 Stunden inkubiert
- 2) 2 µl P.D., 15 Stunden inkubiert

Die alkalische Phosphatase (SIGMA) wurde vor Gebrauch über Sephadex gereinigt. Sie war rein an Endo- sowie Exonuklease-Aktivität. Das pH-Optimum betrug etwa 8,2 in

Gegenwart von 10^{-3} m Mg^{++} . Die Schlangengift-Phosphodiesterase (Worthington, Code VPH), rein an Monophosphoesteraseaktivität wurde unter gleichen Bedingungen benutzt. Alle Phosphatbestimmungen erfolgten nach Chen u.a. (1956).

E.3 UV-spektroskopische Messungen

Es wurden Quarzküvetten mit 1 cm Lichtweg benutzt. Die Extinktionsmessungen wurden in einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ₂ durchgeführt. Eine Optische Dichte-Einheit (OD) ist die Menge von Material pro Milliliter, die einer Extinktion gleich 1 für eine bestimmte Wellenlänge (λ) entspricht. Die Extinktion der Oligonukleotide wurde bei 271 m μ abgelesen, da hier die molekulare Extinktion der 4 Desoxyribonukleotide nur innerhalb 10 % voneinander abweicht.

E.4 Isolierung der hochmolekularen DNS

Die DNS wurde aus frischem Kalbsthymus nach Kay u.a. (1952) mit Duponol isoliert. Der Proteingehalt der DNS bestimmt nach Lowry (1951) betrug weniger als 0,5 %.

E.5 Bestrahlungsbedingungen

Proben von wässriger DNS-Lösung, pH 7, in Konzentrationen von 0,5 mg/ml wurden nach 10 Minuten Stickstoff-Anreicherung bestrahlt. Die Bestrahlung geschah in einer Kobalt-60- γ -Quelle (Gammacell 220, Atomic Energy of Canada). Die Dosisleistung am Ort der Probe entsprach 21 KR/min. Gleich nach der Bestrahlung wurde die Probe im Rotationsverdampfer eingeeengt und auf eine Säule aufgetragen. Um eine mögliche Beeinflussung durch einen Zeitfaktor auszuschalten, wurde die Zeitspanne zwischen Bestrahlung und Auftragen konstant gehalten.

E.6 Säulenchromatographische Methoden

Diese Methoden bilden unsere Hauptverfahren zur Trennung von Substanzen, da sich damit noch Substanzen trennen lassen, die in großen Konzentrationsunterschieden vorliegen. Bei allen säulenchromatographischen Trennungen wurde die UV-Absorption des Eluats bei 254 m μ mit einem Durchflußphotometer kontinuierlich registriert (Uvicord, LKB, Stockholm mit Punktschreiber), zum Auffangen der Fraktionen wurde ein Fraktionssammler Ultrorac der gleichen Firma verwendet. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde durch eine Peristaltic-Pumpe (LKB) konstant gehalten. Jeder verwendete Austauscher wurde vor dem Reinigungsverfahren in Wasser aufgeschwemmt, abdekantiert und das überstehende Wasser mit den feinen Partikeln abgegossen. Diese Prozedur wurde mehrmals wiederholt.

E.6.1 DEAE-Sephadex A₂₅

Dieses Verfahren ist eine Variante eines Vorschlages von Tomlinson und Tener (1963a) und Rushizky u.a. (1964): DEAE-Sephadex wurde dreimal abwechselnd mit 0,5 n NaOH, Wasser und 0,5 n HCl gewaschen. Anschließend wurde mit Wasser gewaschen bis der Ausfluß neutral war. Obwohl dieses Verfahren genügen sollte, um den Austauscher in die Cl-Form zu bringen, wurden bessere Trennungen erreicht, wenn das Sephadex zwei Stunden in 2 m NaCl gerührt, in die Säule gegeben und mit 2 m NaCl in situ gespült wurde, bis die Extinktion bei 260 m μ = 0 war (ca. 5 x das Säulenvolumen). Dann wurde mit Wasser solange gespült, bis das Eluat von Cl-Ionen frei war. Anschließend wurde das Sephadex in ca. 5-facher Menge Ausgangspuffer (7 m Harnstoff, 0,02 m Tris, pH 7,6) äquilibriert und die dünne Suspension in eine Säule (den gleichen Puffer enthaltend) gefüllt.

Die zu untersuchende Nukleinsäurefraktion ließen wir in einem kleinen Volumen Ausgangspuffer (ca. 6 ml) in die Säule einsickern. Danach wurde 2 - 3 mal mit 1 ml Ausgangs-

puffer nachgewaschen und mit dem Puffer überschichtet. Anschließend wurde eluiert. Dann wurde die Säule mit 7 molarem Harnstoff, pH 7,6 ohne NaCl gewaschen. Daraus lassen sich bereits die Basen und Nukleoside eluieren. Die eigentliche Eluierung der Nukleotide und höherer Glieder setzte dann mit einem ansteigenden linearen NaCl-Konzentrationsgradienten in 7 molarem Harnstoff bei pH 7,6 ein. Die Gradienten wurden in üblicher Weise durch kommunizierende Gefäße erzeugt, wobei das erste Gefäß die Ausgangs- und das zweite die Endmolarität enthält. Weitere Einzelheiten der verschiedenen Verfahren, wie Säulenlänge, Gradienten-Volumen, Molarität, Durchflußrate und Fraktionsvolumen sind unter den Abbildungen angegeben.

E.6.2 DEAE-Cellulose-Acetat-Form

DEAE-Cellulose wurde mit 0,5 n NaOH und 0,5 n HCl in der schon beschriebenen Weise behandelt, in der mehrfachen Menge 1 n Ammoniumacetat gerührt und anschließend in eine Säule (0,9 x 5 cm) gefüllt. Die DEAE-Cellulose wurde solange mit Ammoniumacetat gewaschen, bis keine Cl-Ionen mehr vorhanden waren (Silbernitrat-Test) und dann noch anschließend mit dem 3-fachen Säulen-Volumen. Anschließend wurde mit dem 10-fachen Säulenvolumen nachgespült. Die Probe (in 0,05 m Ammoniumacetat) wurde ca. 1:5 verdünnt und sorgfältig aufgetragen. Die Nukleoside wurden mit Wasser, die Nukleotide mit 0,3 m Ammoniumacetat eluiert. Die Abwesenheit höherer Oligonukleotide wurde durch Nachspülen mit 1 m Ammoniumacetat geprüft.

E.6.3 Dowex 1 x 8 Acetat-Form

Dowex 1 x 8 Cl⁻ wurde auf dem Büchner Trichter 2 mal mit 1 n HCl, danach mit 2 n NaOH und anschließend mit Wasser gewaschen. Dann wurde es in 1 n Ammoniumacetat aufgeschwemmt, 30 Minuten gerührt und das Wasser abgesaugt. Das Dowex wurde in frischem 1 n Ammoniumacetat in eine

1,35 x 15 cm-Säule gegossen. Die Säule wurde mit 1 Liter 1 n Ammoniumacetat weiter gewaschen und mit 500 ml Wasser gespült. Die Nukleoside wurden in 6 ml aufgetragen (wie bei DEAE-Sephadex) und in 2 Stufen (H_2O und 1 m NH_4 -Acetat, pH 6,7) eluiert.

E.6.4 Dowex 50 x H^+ -Form

Dowex 50 wurde in 2 n NaOH, dann in 2 n HCl 30 Minuten gerührt und in eine Säule gegossen. Zuletzt wurde das Harz mit 2 n HCl in situ, dann mit Wasser neutral gewaschen und in dieser H^+ -Form verwendet.

Für die Auftrennung der Nukleoside und Basen wurde eine 1,35 x 5 cm große Säule (Dowex 50 x 4 (50 - 100 mesh) verwendet. Die Nukleoside wurden mit 0,5 n HCl und die Basen mit 2 n HCl eluiert. Für die Analyse der Basen wurde Dowex 50 x 8 (200 mesh) und eine 1,35 x 18 cm Säule verwendet. Die Basen wurden in 2 n HCl aufgetragen und mit 2 n HCl eluiert.

E.6.5 Dünnschicht-Chromatographie-Elektrophorese

Sie wurde nach der Methode von Keck und Hagen (1964) durchgeführt, nur wurde bei der Elektrophorese eine 1000 V-Spannung für 45 Minuten angewandt.

E.7 Entsalzung

Die Elution der DEAE-Sephadex-Säulen benötigt NaCl und Harnstoff. Da die Anwesenheit der Chlorid-Ionen und Harnstoff weitere Behandlungen stört, ist es erforderlich, zwischen jeder Chromatographie die Peaks zu entsalzen. Das Prinzip dieser Entsalzung ist, das Nukleotid-Material auf Ionenaustauscher (Carbonat-Form)-Säulen zu readsorbieren. Dazu wird jeder Peak gesammelt, 1:5 verdünnt, auf pH 8 (Peak 1-5) oder pH 4 (Peak 0) gebracht und durch die Säule gepumpt. Der Harnstoff wurde dann mit Wasser heraus-

gewaschen, danach mit verdünntem NH_4HCO_3 , pH 8,4 oder Wasser für Dowex 50 (s. unten) gespült, bis keine Chlorid-Ionen mehr herausströmen. Dies kann man leicht mit AgNO_3 prüfen. Die optische Dichte des Eluats wurde stets kontrolliert, um sicher zu sein, daß keine UV-absorbierenden Materialien eluiert wurden. Anschließend wurde das Nukleotid-Material mit 2 m NH_4HCO_3 , pH 8,4, eluiert und mit dem Rotationsverdampfer im Wasserbad (Temperatur $< 30^\circ$) bis zur Trockenheit eingeengt. Dem Rückstand wurde Wasser zugefügt und der Prozeß 2 - 3 mal wiederholt bis kein NH_4HCO_3 verblieb. Die letzten Ionenspuren wurden durch ein Ionenverzögerungsharz AG 11 A 8 eliminiert. Dazu wurde die wässrige Lösung des zu entsalzenden Materials auf eine 1,45 x 60 cm lange Säule gegeben und anschließend mit reinem Wasser herausgespült. Die Durchflußgeschwindigkeit lag in diesem Fall bei etwa 80 ml/Stunde. Die Elution der anorganischen Salze ist verlangsamt. Sie folgen den organischen Materialien als getrennte Fraktion. Nach einer Konzentrierung ist das Eluat für eine weitere Chromatographie oder enzymatische Behandlung vorbereitet.

Als Austauscher benutzten wir für Peak 3, 4 und 5 DEAE-Cellulose- HCO_3^- -Form (Rushizky und Sober 1962) in einer 2,45 x 25 cm-Säule (100 ml/h) und für Peak 0, 1 u. 2 Dowex 1 x 8 HCO_3^- -Form in einer 1,35 x 8 cm-Säule. Die gereinigten Harze (s. oben) wurden in sehr viel 2 n NH_4HCO_3 gewaschen, bis die optische Dichte des Eluats bei 260 m μ gleich 0 war. Anschließend wurde mit ca. dem 5-fachen Säulenvolumen Wasser gespült, um den Ionenüberschuß zu eliminieren. Für Peak 0 wurden eine 8 x 1,35 cm-Säule mit Dowex 50 x 8 NH_4^+ -Form benutzt (Bell, Tomlinson und Tener 1964). Das Harz wurde erst mit 2 n HCl, dann mit 2 n NH_4OH jeweils 30 Minuten gerührt, in situ mit 2 n NH_4OH gewaschen und mit Wasser nachgespült.

F. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird über die chemischen Reaktionen, die in der DNS nach Einwirkung ionisierender Strahlen Brüche in der Nukleotidkette hervorrufen, berichtet. Diese Untersuchungen wurden vorzugsweise durch die Charakterisierung strahlenbedingter Oligonukleotide mit geeigneten Chromatographieverfahren und mit enzymatischen und chemischen Methoden vorgenommen. Mechanismen, die zunächst zur Entstehung der Brüche in der bestrahlten DNS führen und diejenigen, die über die Alkalilabilität der entstandenen Verbindungen Auskunft geben, wurden diskutiert. Zur Ergänzung und zur Stützung der vorgeschlagenen Mechanismen wurden ferner einige Versuche mit hochmolekularer DNS mit nur wenigen Brüchen durchgeführt. Aus unseren Untersuchungen resultiert folgendes:

1. Als Strahlenprodukte ergeben sich dihydroxylierte, monophosphorylierte und diphosphorylierte Oligonukleotide. Die dihydroxylierten Oligonukleotide überwiegen dabei.
2. Nach Alkalibehandlung der bestrahlten DNS findet sich eine Zunahme a) der Nukleoside, b) der phosphorylierten Oligonukleotide und c) der Cyclophosphate.
d) Die Zahl der freigesetzten Basen ändert sich nur wenig.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ziehen: Zu 1) Die Oxydation des endständigen Zuckers führt zur gleichzeitigen Abspaltung der endständigen Phosphatgruppe. Dabei nehmen die hydroxylierten Enden zu. Zu 2 a) und b) Die β -Eliminierung des am Zucker oxydierten endständigen Nukleosids führt zur Zunahme der phosphorylierten Enden. Unsere Untersuchungen an hochmolekularer DNS unterstützen diese Beobachtungen. Zu 2 c) Die Oxydation am C_1 -Atom des Zuckers könnte nach Verlust der Base zu Cyclophosphaten führen.

Zu 2 d) Die Nukleosidbasen werden unmittelbar bei der Bestrahlung freigesetzt. Gleichzeitig entsteht dabei durch Zyklisierung und β -Eliminierung ein Bruch der Nukleotidkette. Aus dem Vergleich zwischen dem G-Wert der Freisetzung der Basen ($G = 0,192$) und dem aller Brüche ($G = 0,4$) ergibt sich, daß in bestrahlter DNS die Hälfte der Brüche eine Folge der Freisetzung der Base ist. Die übrigen Brüche würden als Folge einer Oxydation des Zuckers und gleichzeitiger β -Eliminierung entstehen. Dabei wird auch ein Nukleosid freigesetzt.

G. Literaturverzeichnis

Alexander, P. and M. Fox (1955)

Post-effets dans la polymérisation des solutions aqueuses d'acide methacrylique amorcée par les rayons X.

J. Chim. Phys. 52, 710

Baer, E. and M. Kates (1948)

Migration during hydrolysis of esters of glycerophosphoric acid.

J. Biol. Chem. 175, 79

Bailly, O. et J. Gaumé (1935)

Sur le mécanisme de l'hydrolyse dans la série des diesters orthophosphoriques.

Bull. Soc. Chim. 2, 354

Bayley, C.R., K.W. Brammer and A.S. Jones (1961)

The Alkaline Degradation of Apurinic Acids.

J. Chem. Soc., 1903

Beaven, G.H. and E.R. Holiday (1955)

S. 493 in: The Nucleic Acids (Ed. E. Chargaff, J.N. Davidson). Vol. I, Academic Press, N.Y.

Bell, D., R.V. Tomlinson and G.M. Tener (1964)

Chemical Studies on Mixed Soluble Ribonucleic Acids from Yeast.

Biochem. 3, 317

Bernhard, W. and W. Snipes (1968)

Electron Spin Resonance of Gamma-irradiated Single Crystal of 3'-Cytidilic Acid.

Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 1038

Brown, D.M. and A.R. Todd (1952)

The Synthesis of Adenylic a and b from 5'-Trityl Adenosine.

J. Chem. Soc., 44

- Brown, D.M. and A.R. Todd (1955)
Chemical Bonds in Nucleic Acids.
The Nucleic Acids, Vol. I, Academic Press, N.Y., 444
- Butler, J.A.V. and B.E. Conway (1953)
The action of photochemically generated radicals from
hydrogen peroxide on deoxyribonucleic acid and simple
model substances.
Proc. Roy. Soc. B 141, 562
- Butler, J.A.V. (1956)
The Action of Ionizing Radiations on Biological Materials.
Rad. Res. 4, 20
- Cavalier, J. (1898)
Vitesse de saponification des ethers phosphoriques.
Compt. rend. 127, 114
- Chen, P.S., T.Y. Toriba and H. Warnes (1956)
Microdetermination of Phosphorus.
Anal. Chem. 28, 1756
- Collyns, B., S. Okada, G. Scholes, J.J. Weiss and C.M.
Wheeler (1965)
Chain Scission and Hydrogen Bond Breakage on Irradiation
of DNA.
Rad. Res. 25, 526
- Cohn, W.E. and F.J. Bollum (1961)
Chromatography and desalting of nucleotides with ammonium
bicarbonate on anion-exchange columns.
Biochem. Biophys. Acta 48, 588
- Cohn, W.E. (1961)
Ion-Exchange Chromatography.
Chromatography, Reinhold publishing C^o, N.Y., 554

Cox, R.A., W.G. Overend, A.R. Peacock and S. Wilson (1958)
The action of X-rays on sodium deoxyribonucleate in
solution.

Proc. Roy. Soc. B 149, 511

Daniels, M. G. Scholes and J.J. Weiss (1955)
Studies on the Action of X-Rays on Aqueous Solutions of
Nucleic Acids and Some Nucleotides.

Experientia XI, 219

Daniels, M., G. Scholes and J.J. Weiss (1956)
Chemical action of ionizing radiations in solution.
Formation of labile phosphate esters from purin and
pyrimidin ribonucleotides by irradiation with X-rays in
aqueous solution.

J. Chem. Soc. 3771

Desjobert, A. (1947)
Etude de l'hydrolyse de l'acide monoethylorthophosphorique.
Bull. Soc. Chim. 111, 809

Eigner, J., H. Boedtker, G. Michaels (1961)
The thermal degradation of nucleic acid.
Biochim. Biophys. Acta 51, 165

Emmerson, R.E., G. Scholes, D.H. Thomson and J.F. Ward (1960)
Chemical effects of ionizing radiations on nucleic acids
and nucleoproteins.

Nature 187, 319

Georgatsos, J.G. and M. Laskowski, Sr. (1962)
Purification of an Endonuclease from the Venom of Bothrops
atrox.

Biochem. 1, 288

Gordy, W.
Free radicals from biological purines and pyrimidines.
Ann. N.Y. Acad. Sci., im Druck.

Hagen, U. (1967)

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

Biochim. Biophys. Acta 134, 45

Harbers, H. (1964)

S. 21 in: Die Nukleinsäuren.

G. Thieme Verlag, Stuttgart

Kay, E.R.M., N.S. Simmons and A.L. Dounce (1952)

An improved Preparation of Sodium-Deoxyribonucleate.

J. Amer. Chem. Soc. 74, 1724

Keck, K. und U. Hagen (1964)

Trennung von DNS-Bausteinen auf Celluloseschichten.

Biochim. Biophys. Acta 87, 685

Keck, K. (1966)

Dissertation, Universität Freiburg.

Koshland, D.E. (1952)

Effect of Catalysts on the Hydrolysis of Acetyl Phosphate.

Nucleophilic Displacement Mechanisms in Enzymatic Reactions.

J. Amer. Chem. Soc. 74, 2286

Kosolapoff, G.M. (1950)

S. 322 in: Orgaphosphorus Compounds.

J. Wiley & Sons, N.Y.

Lowry, L.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

Markham, R. and D. Smith (1952)

Cyclic Nucleotides produced by Ribonuclease and by Alkaline Hydrolysis.

Bioch. J. 52, 552

Michelson, A.M. (1958)

Synthesis of Ribonucleic Acid.

Nature 181, 303

Phillips, G.O. (1954)

Action of Ionizing Radiation on Aqueous Solutions of Carbohydrates.

Nature 173, 1044

Pullman, B. (1963)

La Biochimie Electronique.

Presses Universitaires de France 1075, 37

Rhease, H.J. and E. Freese (1968)

Base liberation and backbone breakage of DNA and oligodeoxyadenylic acid induced by hydrogen peroxyde and hydroxylamin.

Biochem. Biophys. Acta 155, 476

Rushizky, G.W. and H.A. Sober (1962)

Desalting of mono- and oligonucleotides.

Biochem. Biophys. Acta 55, 217

Rushizky, G.W., E.M. Bartos and H.A. Sober (1964)

Chromatography of mixed Oligonucleotides on DEAE-Sephadex.

Biochemistry 3, 626

Scholes, G. and J.J. Weiss (1952)

Chemical action of X-rays on nucleic acids and related substances (part I).

Exptl. Cell. Research, Suppl. 2, 219

Scholes, G. and J.J. Weiss (1954)

Chemical action of X-rays on nucleic acids and related substances in aqueous systems (part II).

Biochem. J. 56, 65

Scholes, G., J.F. Ward and J.J. Weiss (1960)

Mechanism of the radiation-induced degradation of nucleic acids.

J. Mol. Biol. 2, 379

Smith, M., J.G. Moffat and H.G. Khorana (1958)

A new and general method for the chemical synthesis of the C₅'-C₃'-internucleotidic linkage. Synthesis of desoxy-ribo-dinucleotides.

J. Amer. Chem. Soc. 80, 6212

Tamm, C., H.S. Shapiro, R. Lipshitz and E. Chargaff (1953)

Distribution density of nucleotides within a desoxyribo-nucleic acid chain.

J. Biol. Chem. 203, 673

Tener, M., H.G. Khorana, R. Markham and E.H. Pol (1958)

The Synthesis and Characterisation of Linear and Cyclic Thymidine Oligonucleotides.

J. Amer. Chem. Soc. 80, 6223

Tomlinson, R.V. and G.M. Tener (1963a)

The Effect of Urea, Formamide and Glycols on the Secondary Binding Forces in Ion-Exchange Chromatography of Polynucleotides on DEAE-Cellulose.

Biochemistry 2, 697

Tomlinson, R.V. and G. Tener (1963b)

A Proposed General Procedure for Isolating End-Groups of Nucleic Acids.

Biochemistry 2, 703

Weiss, J.J. (1964)

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

Progress in Nucleic Acid Research and Molecularbiology, Academic Press N.Y. 3, 102

H. Tabellen und Abbildungen

Tab. 1: Prozentuale Zusammensetzung der durch Chromatographie über DEAE-Sephadex A 25 verschiedenen erhaltenen Fraktionen nach γ -Bestrahlung mit 200 kR und 400 kR. Angaben in % der Gesamt-OD 271 m μ eluiert in den verschiedenen Peaks.

Dosis	L a d u n g							
	0	I	II	III	IV	V	VI	> VI
200 kR	5,60	1,60		0,90	2,40	2,50	3,40	83,60
400 kR	10,45	0,41	3,25	2,89	4,26	5,53	6,80	66,41

Tab. 2: Prozentuale Zusammensetzung des Peak III nach
 Rechromatographie über DEAE-Sephadex A 25.
 Angaben in % der Gesamt-OD 271 μ eluiert in jedem Peak.

Behandlung	Peak-Nummer	
	III 1	III 2
Kontrolle	25,5 %	74,5 %
Monophosphoesterase	36,5 %	63,5 %

Tab. 3: Erwartete Veränderungen des Peak III nach schonender alkalischer Inkubation (pH = 8,4).

X = Nukleosid.

p = Phosphatgruppe.

$p_c R$, $R_c p$ = Caclophosphat.

R stellt ein Nukleosid mit oxydiertem Zucker dar. Dabei kann die Base auch fehlen.

Zahl der Ladungen als Index.

(1), Oxydation am C_1 - bzw. C_5 - Atom des Zuckers.

(2), Oxydation am C_3 - bzw. C_4 - Atom des Zuckers.

(3), 3'-4' bzw. 2'-3' Zyklisierung.

(4), 4'-5' Zyklisierung.

Unterstrichen sind die experimentell gefundenen Abbauprodukte.

virtuelle Zusammen- setzung nach Be- strahlung	verschiedene Mechanismen der Alkalilabilität			
	β-Eliminierung		Zyklisierung	
	(1)	(2)	(3)	(4)
XpXpXpR XpXpRpX XpRpXpX RpXpXpX	<u>XpXpXpR₃</u> XpXpR ₂ + pX ₂ <u>XpR₁</u> + <u>pXpX₃</u> R ₀ + pXpXpX ₄	XpXpXp ₄ + R ₀ <u>XpXp₃</u> + <u>RpX₁</u> Xp ₂ + RpXpX ₂ <u>RpXpXpX₃</u>	XpXpX ₂ + p _c R ₁ XpX ₁ + p _c RpX ₂ X ₀ + p _c RpXpX ₃ <u>RpXpXpX₃</u>	<u>XpXpXpR₃</u> XpXpR _c p ₃ + X ₀ XpR _c p ₂ + XpX ₁ R _c p ₁ + XpXpX ₂
XpRp RpXp	<u>XpR₁</u> + p R ₀ + pXp ₄	Xp ₂ + Rp ₂ <u>RpXp₃</u>	X ₀ + p _c Rp ₃ <u>RpXp₃</u>	XpR _c p ₂ R _c p ₁ + Xp ₂
pXpR pRpX	<u>pXpR₃</u> pR ₂ + pX ₂	pXp ₄ + R ₀ p + <u>RpX₁</u>	pX ₂ + p _c R ₁ p _c RpX ₂	<u>pXpR₃</u> pR _c p ₃ + X ₀

Tab. 4: Erwartete Veränderungen des Peak IV nach 1 m NH_4OH -Inkubation, 30 Min. bei 37°C
 Legende siehe Tab. 3.

Virtuelle Zusammensetzung nach Bestrahlung	Verschiedene Mechanismen			
	β-Eliminierung		Zyklisierung	
	(1)	(2)	(3)	(4)
XpXpXpXpR XpXpXpRpX XpXpRpXpX XpRpXpXpX RpXpXpXpX	XpXpXpXpR_4 $\text{XpXpXpR}_3 + \text{pX}_2$ $\text{XpXpR}_2 + \text{pXpX}_3$ $\text{XpR}_1 + \text{pXpXpX}_4$ $\text{R}_0 + \text{pXpXpXpX}_5$	$\text{XpXpXpXp}_5 + \text{R}_0$ $\text{XpXpXp}_4 + \text{RpX}_1$ $\text{XpXp}_3 + \text{RpXpX}_2$ $\text{Xp}_2 + \text{RpXpXpX}_3$ RpXpXpXpX_4	XpXpXpXpF_4 $\text{XpXpXpR}_c\text{p}_4 + \text{X}_0$ $\text{XpXpR}_c\text{p}_3 + \text{XpX}_1$ $\text{XpR}_c\text{p}_2 + \text{XpXpX}_2$ $\text{R}_c\text{p} + \text{XpXpXpX}_3$	$\text{XpXpXpX}_3 + \text{p}_c\text{R}_1$ $\text{XpXpX}_2 + \text{p}_c\text{RpX}_2$ $\text{XpX}_1 + \text{p}_c\text{RpXpX}_3$ $\text{X}_0 + \text{p}_c\text{RpXpXpX}_4$ RpXpXpXpX_4
XpXpRp XpRpXp RpXpXp	$\text{XpXpR}_2 + \text{p}$ $\text{XpR}_1 + \text{pXp}_4$ $\text{R}_0 + \text{pXpXp}_5$	$\text{XpXp}_3 + \text{Rp}_2$ $\text{Xp}_2 + \text{RpXp}_3$ RpXpXp_4	XpXpR_cp_3 $\text{XpR}_c\text{p}_2 + \text{Xp}_2$ $\text{R}_c\text{p} - \text{XpXp}_3$	$\text{XpX} + \text{p}_c\text{Rp}_3$ $\text{X}_0 + \text{p}_c\text{RpXp}_4$ RpXpXp_4
pXpXpR pXpRpX pRpXpX	pXpXpR_4 $\text{pXpR}_3 + \text{pX}_2$ $\text{pR}_2 + \text{pXpX}_3$	$\text{pXpXp}_5 + \text{R}_0$ $\text{pXp}_4 + \text{RpX}_1$ $\text{p} + \text{RpXpX}_2$	pXpXpR_4 $\text{pXpR}_c\text{p}_4 + \text{X}_0$ $\text{pR}_c\text{p}_3 + \text{XpX}_1$	$\text{pXpX}_3 + \text{p}_c\text{R}_1$ $\text{pX}_2 + \text{p}_c\text{RpX}_2$ p_cRpXpX_3
pRp	$\text{pR}_2 + \text{p}$	$\text{p} + \text{Rp}_2$	pR_cp_3	p_cRp_3

Tab. 5a: Rechromatographie des Peak IV nach 1 m NH₄OH-Inkubation 30 Min. bei 37°C.

N, D, T, T_e = Nukleosid, Di- Tri- Tetrahydroxylierte Nukleotide %

N_p D entsprechen den phosphorylierten Nukleotiden.

X = Nukleoside, p = Phosphatgruppe, R = Nukleoside mit oxydiertem Zucker.

R* = oxydierter Zucker mit abgespaltener oder veränderter, nicht mehr UV-absorbierender Base.

p_cR, R_cp = Cyclophosphate.

Angaben in % der Gesamt-OD_{271m_u} eluiert in den verschiedenen Peak.

IV ₀	IV ₁	IV ₂	IV ₃	IV ₄	IV ₅
$\left. \begin{array}{l} X \\ R^* \\ R \end{array} \right\} N$	$\left. \begin{array}{l} XpR \\ XpX \\ R^*_c p^D \\ p_c R^* \end{array} \right\}$	$\left. \begin{array}{l} XpXpX \\ XpXpR \\ p_c RpX \\ XpR_c p \\ pX \\ Xp \\ pR \\ Rp \end{array} \right\} T$ 0,81 $\left. \begin{array}{l} N_p \\ 0,64 \end{array} \right\}$	$\left. \begin{array}{l} XpXpXpX \\ XpXpXpR \\ RpXpXpX \\ p_c RpXpX \\ XpXpR_c p \\ pXpX \\ XpXp \\ pXpR \\ RpXp \\ p_c R^* p \\ pR^*_c p \end{array} \right\} T_e$ 7,24-8,62 $\left. \begin{array}{l} D_p \\ 0,68-2,06 \end{array} \right\}$	$\left. \begin{array}{l} XpXpXpXpR \\ RpXpXpXpX \\ p_c RpXpXpX \\ XpXpXpR_c p \\ pXpXpX \\ XpXpXp \\ RpXpXp \\ pXpXpR \\ pXpR_c p \\ p_c RpXp \\ pXp \end{array} \right\} P$ 70,5-71,2 $\left. \begin{array}{l} T_p \\ 5,49 \\ 9-9,7 \\ N_{p2} \\ 4,26 \end{array} \right\}$	$\left. \begin{array}{l} pXpXpXpX \\ pXpXp \end{array} \right\} T_{ep}$ 0-1,39 $\left. \begin{array}{l} D_{p2} \\ 0-1,39 \end{array} \right\}$
a 6,75%	b 0,94%	c 1,45 %	d 9,30 %	e 80,20 %	f 1,39 %

Tab. 5b: Rechromatographie eines zweiten Aliquots des Peak IV nach Alkali-Inkubation mit anschließender Monophosphoesterase-Behandlung.

} : entstanden aus
 Legende siehe Tab. 5a.

IV ₀ '	IV ₁ '	IV ₂ '	IV ₃ '	IV ₄ '	IV ₅ '
N	D	T	T _e	P	
$\left. \begin{array}{l} X \\ R \\ X \end{array} \right\} \begin{array}{l} N_p \\ \\ N_{p2} \end{array}$	$\left. \begin{array}{l} X_p X \\ X_p X \\ X_p R \\ R_p X \\ p_c R^* \\ R_c^* p \end{array} \right\} \begin{array}{l} D_{p2} \\ \\ D_p \end{array}$	$\left. \begin{array}{l} X_p X_p X \\ R_p X_p X \\ X_p X_p R \\ X_p R_c p \\ p_c R_p X \end{array} \right\} \begin{array}{l} T_p \end{array}$	$\left. \begin{array}{l} X_p X_p X_p X \end{array} \right\} T_{ep}$	-	-
a' 11,4 %	b' 3,0 %	c' 6,3 %	d' 8,1 %	e' 71,2 %	0

Tab. 5c: Rechromatographie des Peak IV₄ nach Monophosphoesterase-Behandlung (vergl. Tab. 5a).

Legende siehe Tab. 5a.

IV ₄₀	-	IV ₄₋₂	-	IV ₄₋₄	
X } N _{p2}		$\left. \begin{array}{l} X_p X_p X \\ R_p X_p X \\ X_p X_p R \\ X_p R_c p \\ p_c R_p X \end{array} \right\} T_p$		$\left. \begin{array}{l} X_p X_p X_p X_p R \\ R_p X_p X_p X_p X \\ p_c R_p X_p X_p X \\ X_p X_p X_p R_c p \end{array} \right\} P$	
* a" 4,26 %		* b" 5,49 %		* c" 70,50 %	

*) Angaben auf 80,20 % bezogen (vergl. Tab. 5a)

Tab. 6: Identifizierung und prozentuale Zusammensetzung der identifizierten Nukleoside und Basen.

Nukleoside	$E_{250m\mu}/E_{260m\mu}$		$E_{280m\mu}/E_{260m\mu}$		$E_{290m\mu}/E_{260m\mu}$		μmole	%
	1	2	1	2	1	2		
dC	0,83	0,84	0,965	0,96	0,305	0,314	0,433	24,9
dA	0,78	0,79	0,144	0,138	0,002	0,008	0,293	16,85
dT	0,65	0,658	0,73	0,772	0,240	0,244	0,606	34,85
dI	1,68	1,75	0,25	0,31	0,025	0,050	0,089	5,10
dG	1,15	1,196	0,67	0,713	0,285	0,275	0,318	18,30

1. Angaben von Harbers (1964) bei pH 7 und Beaven and Holiday (1955) für dI.
2. Experimentell bestimmt.
3. Nach den $\epsilon_{260m\mu}$ -Werten von Harbers (1964) umgerechnet.

Basen	$E_{250m\mu}/E_{260m\mu}$		$E_{280m\mu}/E_{260m\mu}$		$E_{290m\mu}/E_{260m\mu}$		μmole	%
	1	2	1	2	1	2		
G	1,37	1,13	0,84	0,815	0,50	0,45	0,298	15,15
A	0,76	0,777	0,375	0,416	0,035	0,037	0,460	23,40
T	0,67	0,696	0,53	0,569	0,09	0,132	0,773	39,40
C	0,48	0,519	1,53	1,49	0,78	0,79	0,434	22,05

1. Angaben von Beaven and Holiday (1955) bei pH 1-2.
2. Experimentell bestimmt.
3. Nach den $\epsilon_{260m\mu}$ -Werten von Beaven and Holiday umgerechnet.

Tab. 7a: Rechromatographie des Peak IV' nach 0,1 n HCl-Inkubation, 5 Min. bei 100°C

X = Nukleoside.

R = Nukleoside mit oxydiertem Zucker.

R* = oxydierter Zucker mit abgespaltener oder veränderter, nicht mehr UV-absorbierender Nukleotidbasen.

IV' 4	IV' 5
XpXpXpXpR	pR*pXpXpX
RpXpXpXpX	XpXpXpR*p
pXpXpX	pXpR*p
XpXpXp	pR*pXp
RpXpXp	
pXpXpR	
pXp	
88,5 %	11,5 %

Tab. 7b: Rechromatographie des Peak IV' 5 nach Monophosphoesterase Behandlung. Legende siehe Tab. 7a. Angaben auf 11,5 % bezogen (vergl. Tab. 7a.).

IV' 5-1	IV' 5-3
XpR*	R*pXpXpX
R*pX	XpXpXpR*
3,8	7,7

Tab. 7c: Rechromatographie des Peak IV' 4 nach Monophosphoesterase Behandlung. Angaben auf 88,5 % bezogen. (vergl. Tab. 7a.).

IV' 4-0	IV' 4-2	IV' 4-4
X	XpXpX RpXpX XpXpR	XpXpXpXpR RpXpXpXpX
10,2	10,9	67,4

Tab. 8: Prozentuale Zusammensetzung der Peak IV₄ und IV'.

Unmittelbar nach Bestrahlung wurde eine DNS-Lösung über DEAE-Sephadex A 25 aufgetrennt. Der Peak IV, der 4 Ladungen entspricht, wurde nach 1 m NH₄OH-Inkubation, 30 Min. bei 37°C auf gleicher Weise wieder chromatographisch aufgetrennt. Der in dieser Chromatographie erhaltene Peak mit 4 Ladungen wird mit IV₄ bezeichnet. Eine andere DNS-Lösung wurde gleich nach Bestrahlung erst in 1 m NH₄OH, 30 Min. bei 37°C inkubiert, dann über DEAE-Sephadex A 25 aufgetrennt. Der Peak IV' ist der, der bei diesem Trennverfahren 4 Ladungen entspricht.

X = Nukleosid, p = Phosphatgruppe.

p_cR, R_cp = Cyclophosphate.

R = oxydierter Zucker bzw. Nukleosid mit oxydiertem Zucker.

Oligonukleotide	IV ₄	IV'		
XpXpXpXpX	} 87,7 - 88,7 %	} 67,4 %		
XpXpXpXpR				
RpXpXpXpX				
XpXpXpR _c p			} 6,7 %	} 7,7 %
p _c RpXpXpX				
pXpR _c p				
p _c RpXp			} 6,8 %	} 3,8 %
pXpXpX				
XpXpXp				
pXpXpR			} 10,9 %	} 14,7 %
RpXpXp				
pXp				
	} 5,3 %	} 10,2 %		

Tab. 9: Grenzviskosität $[\eta]$ unbestrahlter und bestrahlter DNS während der Inkubation mit und ohne alkalische Phosphatase (AP) bei 37 °C.

Zeit (Std.)	unbestrahlt		1000 R.	
	+ AP	- AP	+ AP	- AP
0	-	6100	-	4000
24	6250	6000	4150	4000
48	4900	6500	2850	2700
72	6350	6300	3850	3850
96	6500	7500	3300	4200

Tab. 10: Phosphatabspaltung und säurelösliches UV-absorbierendes Material nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase (AP) und Schlangengift-Phosphodiesterase (PD).

Ansatz	0	5	24	48 Std.
DNS, 50 kR	% Gesamtposphat abgespalten			
- AP, - PD	0,39	0,39	0,77	0,62
- AP, 10 γ PD	0,31	0,31	0,62	0,62
100 γ AP, - PD	0,54	2,40	5,90	7,77
100 γ AP, 10 γ PD	0,46	4,27	7,83	10,55
DNS, 50 kR	% säurelösl. UV-absorb. Material			
- AP, - PD	14,6	17,7	18,4	22,2
25 γ AP, 1 - PD	15,0	16,8	21,2	25,0
DNS, unbestrahlt	% säurelösl. UV-absorb. Material			
- AP, - PD	1,70	2,57	4,01	4,73
25 γ AP, - PD	2,11	2,83	4,46	4,27

Tab. 11: Absolute Menge der identifizierten Oligonukleotide in % der Gesamtmenge an bestrahlter DNS vor und nach einer Alkalibehandlung von 30 min in 1 m NH₄OH bei 37 °C. (400 krad bei 0,5 mg/ml, mittlere Kettenlänge P_n = 10).

Verbindung	Kettenlänge	Ladung	% der Gesamtmenge vor oder nach der Alkalibehandlung	
Basen	1	0	4,80	3,70
Nukleoside	1	0	5,65	9,80
XpX	2	I	0,41	0,92
Xp	1	II	0,19	4,16
XpXpX	3	II	3,06	
XpXp	2	III	1,05	3,46
XpXpXpX	4	III	1,83	
pXp	1	IV	0,26	0,59
pXpX _c p	2	IV	0,022	0,22
XpXpXp	3	IV	0,375	0,64
XpXpXpX _c p	4	IV	0,201	0,49
XpXpXpXpX	5	IV	3,40	3,94
Summe			21,248	27,92

Tab. 12: Häufigkeit der Endgruppen bei Oligonukleotiden gleicher Kettenlänge aus bestrahlter DNS in % der Gesamtmenge sowie in % der jeweiligen Kettenlänge (rel. %).

*) Werte geschätzt aus Versuchen mit anderer Kettenlänge.

Kettenlänge	2		3		4	
Verbindung	Ges.%	rel.%	Ges.%	rel.%	Ges.%	rel.%
dihydroxyliertes Nukleotid: X.....X	0,41	23,4	3,06	79,1	1,74	68,3
Monophosphat: X.....X _p	1,05	59,9	0,375	9,7	0,27*	10,6
Monocyclo- phosphat: X.....X _c p	-	-	0,09*	2,3	0,20	7,8
Diphosphat: pX.....X _p	0,27*	15,4	0,34*	8,9	0,34*	13,3
Monophospho- monocyclo- phosphat: pX.....X _c p	0,022	1,3	-	-	-	-

Abb. 1: Entstehung säurelöslicher UV-absorbierender Substanzen nach Bestrahlung von DNS. Konzentration während der Bestrahlung $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

- Vor Inkubation bei $\text{pH} = 8,3$.
- Nach 48 Stunden Inkubation bei $\text{pH} = 8,3$ und $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

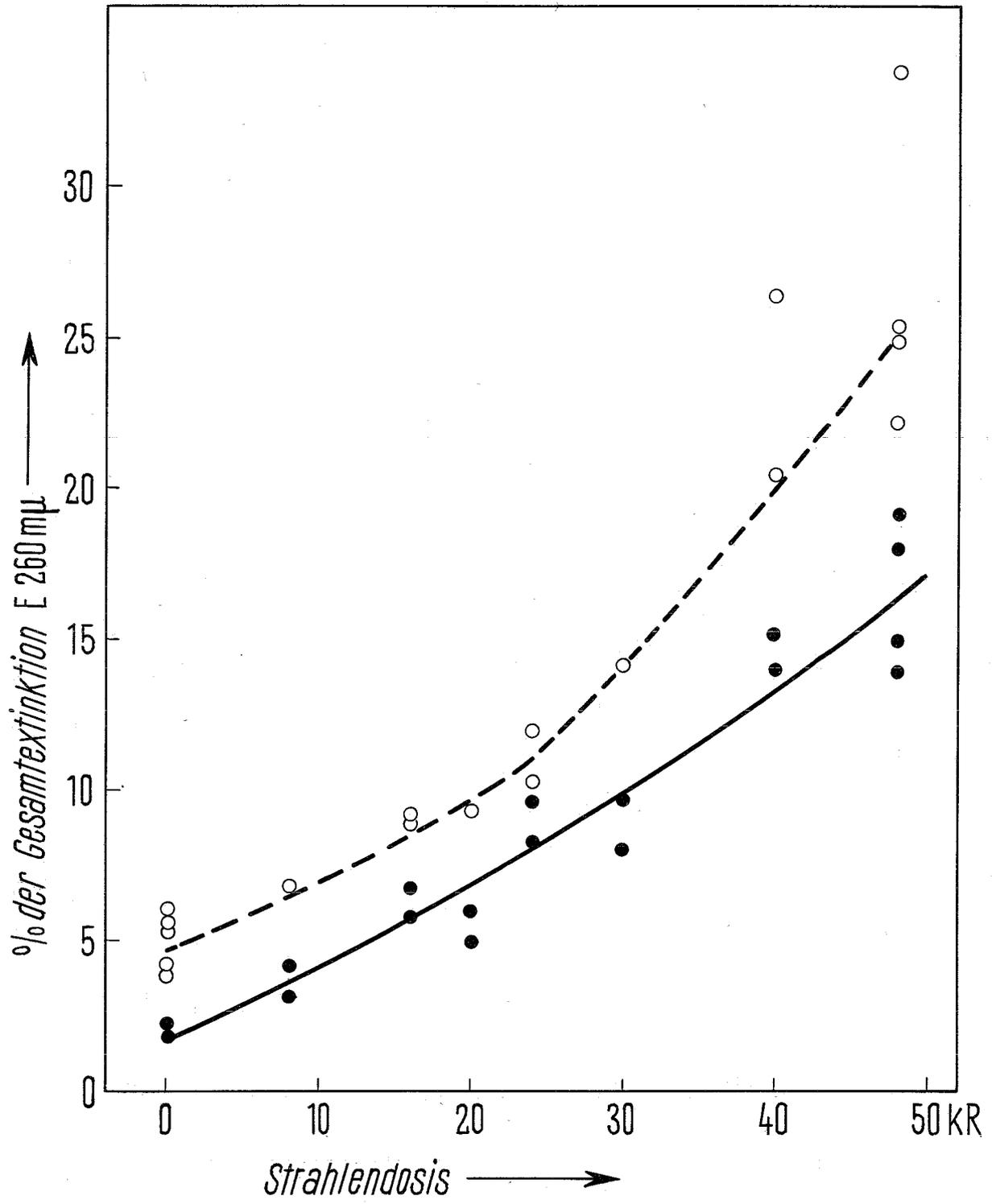


Abb. 2: Kettenlänge (Zahl der Nukleotide) von DNS-Einzelketten nach Bestrahlung von $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Berechnet aus dem G-Wert von 0,4).

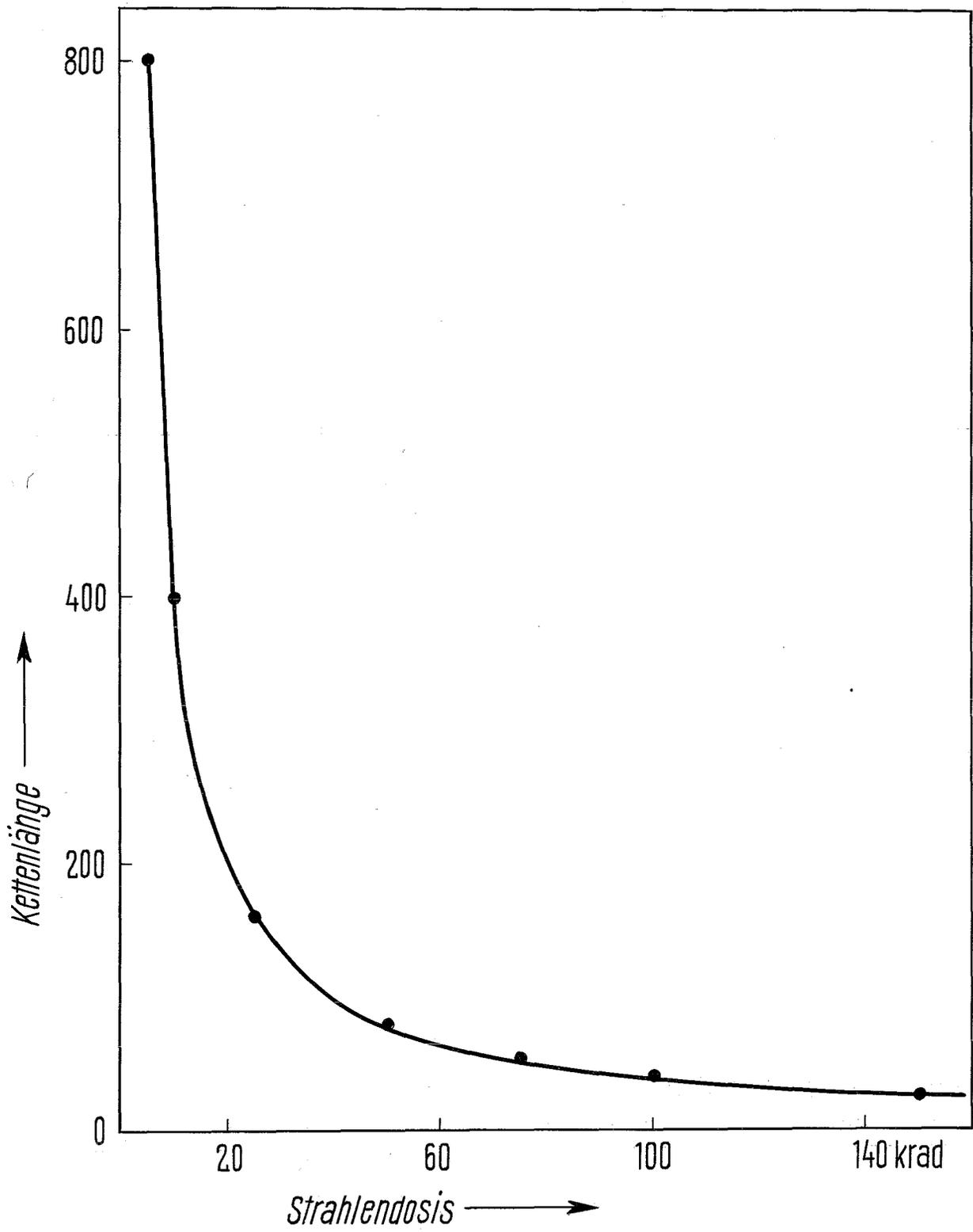


Abb. 3: Chromatographische Auftrennung von 1155 OD 271 μ m bestrahlter DNS (400 kR bei 0,5 mg·ml⁻¹) über DEAE-Sephadex A 25. Die Probe wurde in 8 ml auf eine 1,45 x 25 cm Säule aufgetragen. Elutionsgradient: 3000 ml linearer NaCl-Gradient (0,1 - 0,3 molar) in 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris-Puffer pH = 7,6. Durchflußrate: 53 ml·h⁻¹. Fraktionsvolumen: 10,6 ml. Die römischen Ziffern stellen die Ladung des Peak dar. Peak 0 wurde ohne NaCl eluiert.

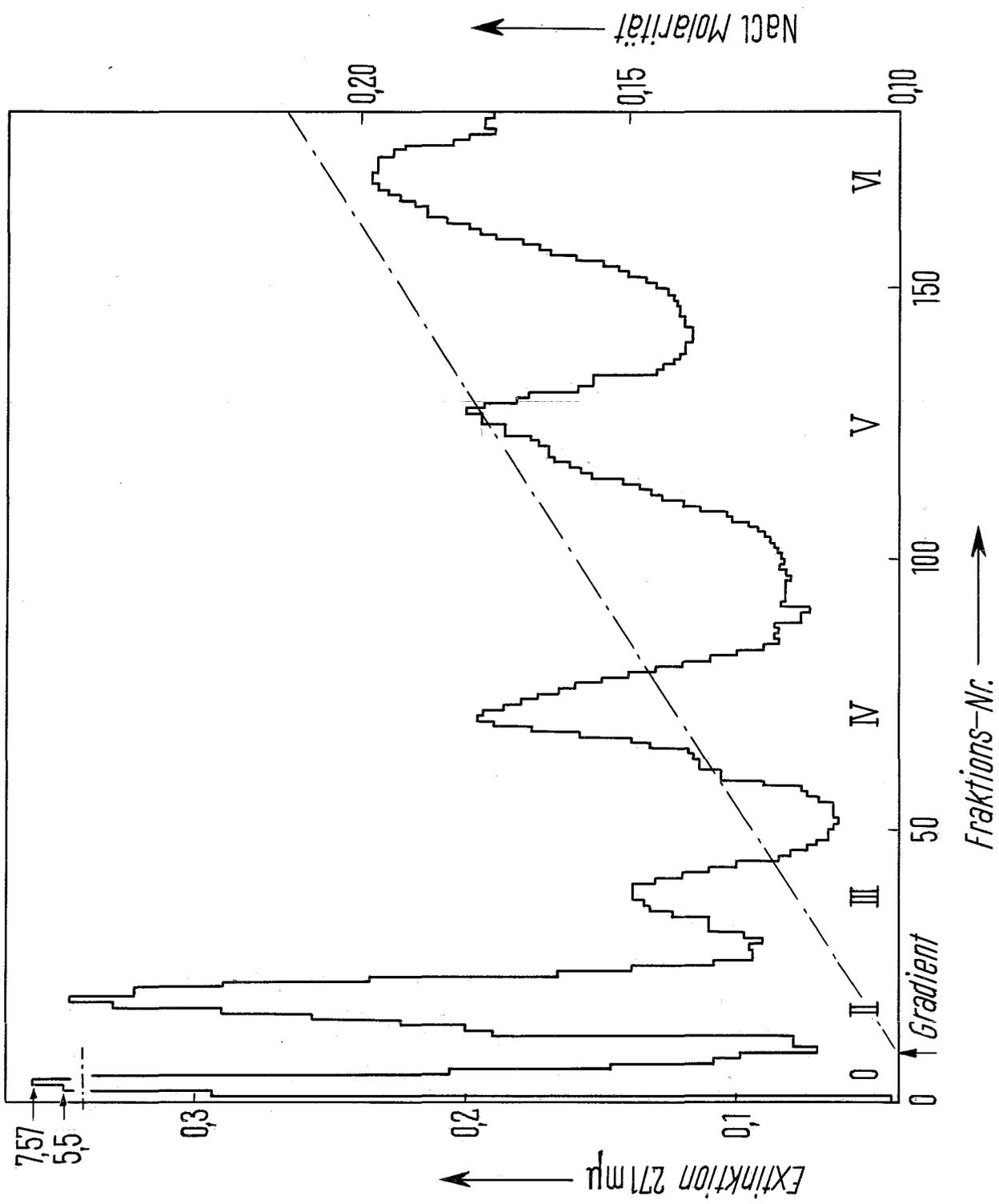


Abb. 4: Chromatographie von 40 OD 271 m^μ Nukleoside und Basen an Dowex 50 x 4. Stufenweise mit HCl eluiert. Säule: 1,35 x 4 cm. Fraktionsvolumen: ca. 7 ml. N = Nukleoside, B = Basen.

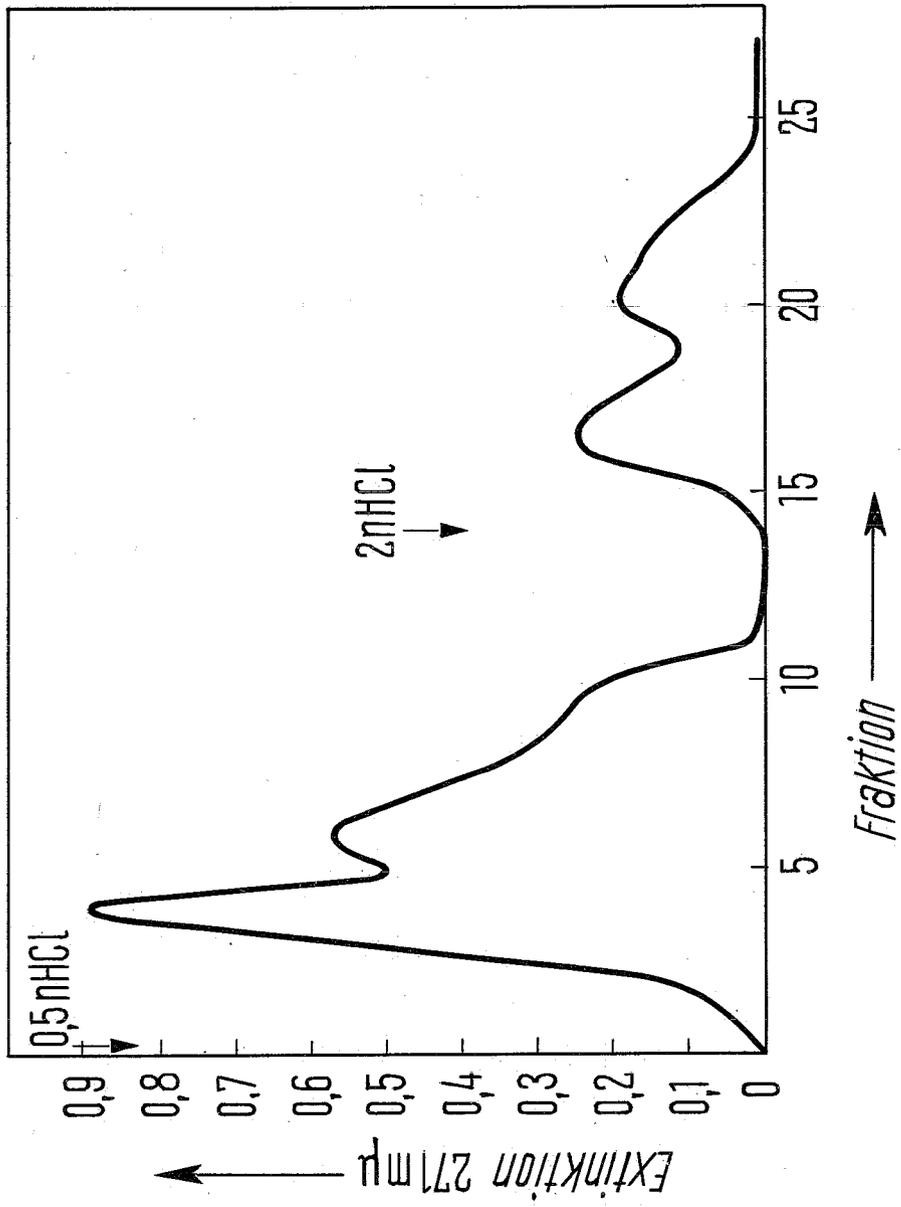


Abb. 5: Rechromatographie von 40 OD 271 m^u des Peak II
an DEAE-Sephadex A 25. Säule: 1,45 x 10 cm.
Elutionsgradient: 300 ml linearer NaCl-Gradient
(0,05 - 0,115 molar) in 7 m Harnstoff, 0,02 m
Tris Puffer pH 7,6. Durchflußrate: 50 ml·h⁻¹.
Fraktionsvolumen: 13,6 ml.

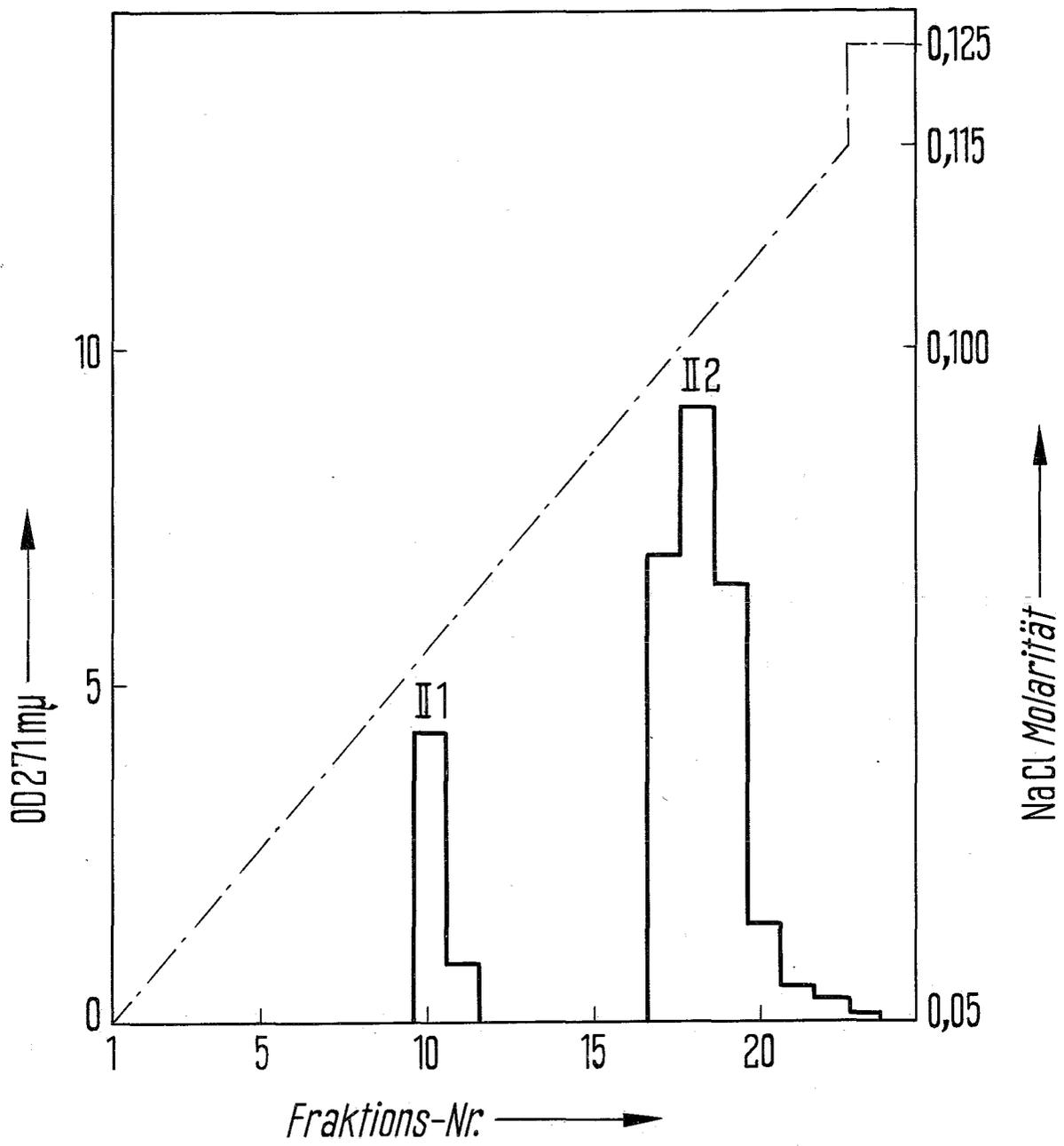


Abb. 6: Rechromatographie von 14 OD 271 m μ des Peak II 2 nach Exonuklease-Abspaltung an DEAE-Sephadex A 25. Säule: 1,45 x 10 cm. Elutionsgradient: 300 ml linearer NaCl-Gradient (0,05 - 0,140 molar) in 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris Puffer pH 7,6. Durchflußrate: 50 ml·h⁻¹. Fraktionsvolumen: 5ml. Der Peak II 2a wurde ohne NaCl eluiert.

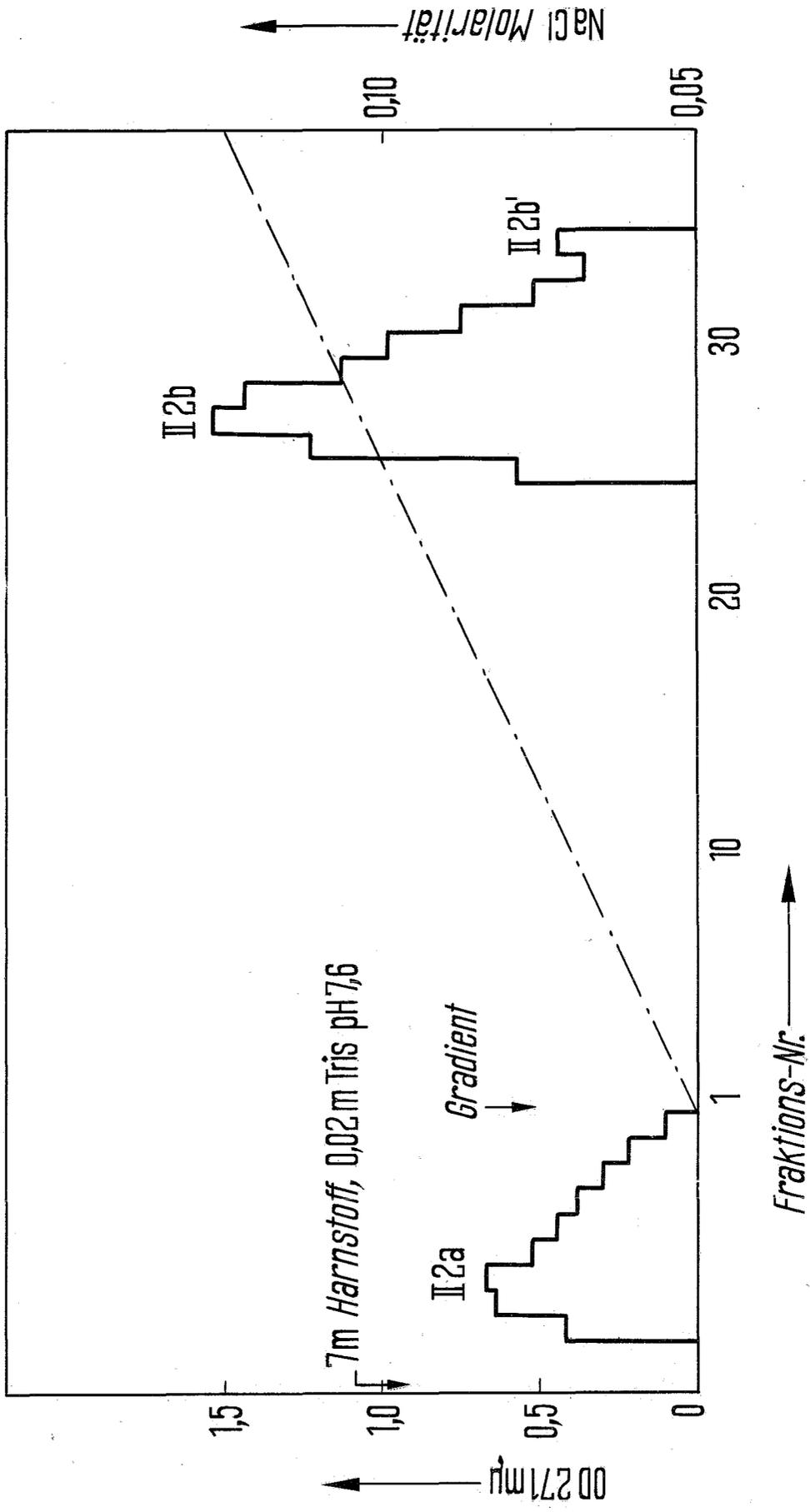


Abb. 7: Rechromatographie von 10 OD 271 m^u des Peak II 2 nach Monophosphoesterase-Behandlung an DEAE-Sephadex A 25. Säule: 1,45 x 10 cm. Elutionsgradient: 300 ml linearer NaCl Gradient (0,05 - 0,140 molar) in 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris Puffer pH 7,6. Durchflußrate: 45 ml·h⁻¹. Fraktionsvolumen: 4,5 ml.

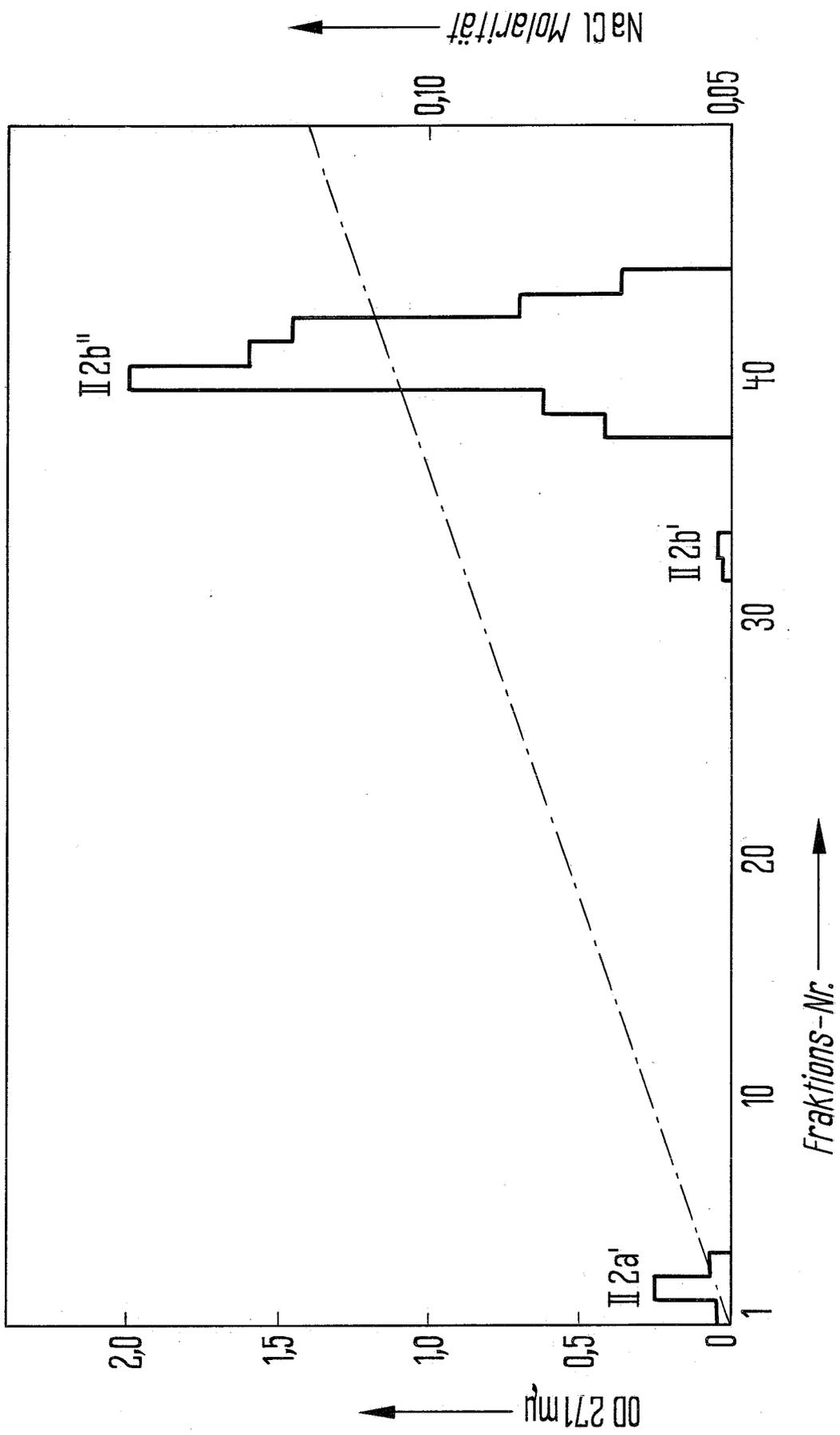


Abb. 8: Chromatographische Auftrennung von einem Exo-
nuklease-Hydrolysat des Peak II 2b" (ca. 3
OD 271 m μ in 0,5 ml) über DEAE-Cellulose (Acetat-
Form). Säule: 0,9 x 4 cm.

1. Nukleoside.

2. Nukleotide.

(siehe Experimenteller Teil E.2 für Ketten-
längen-Bestimmung)

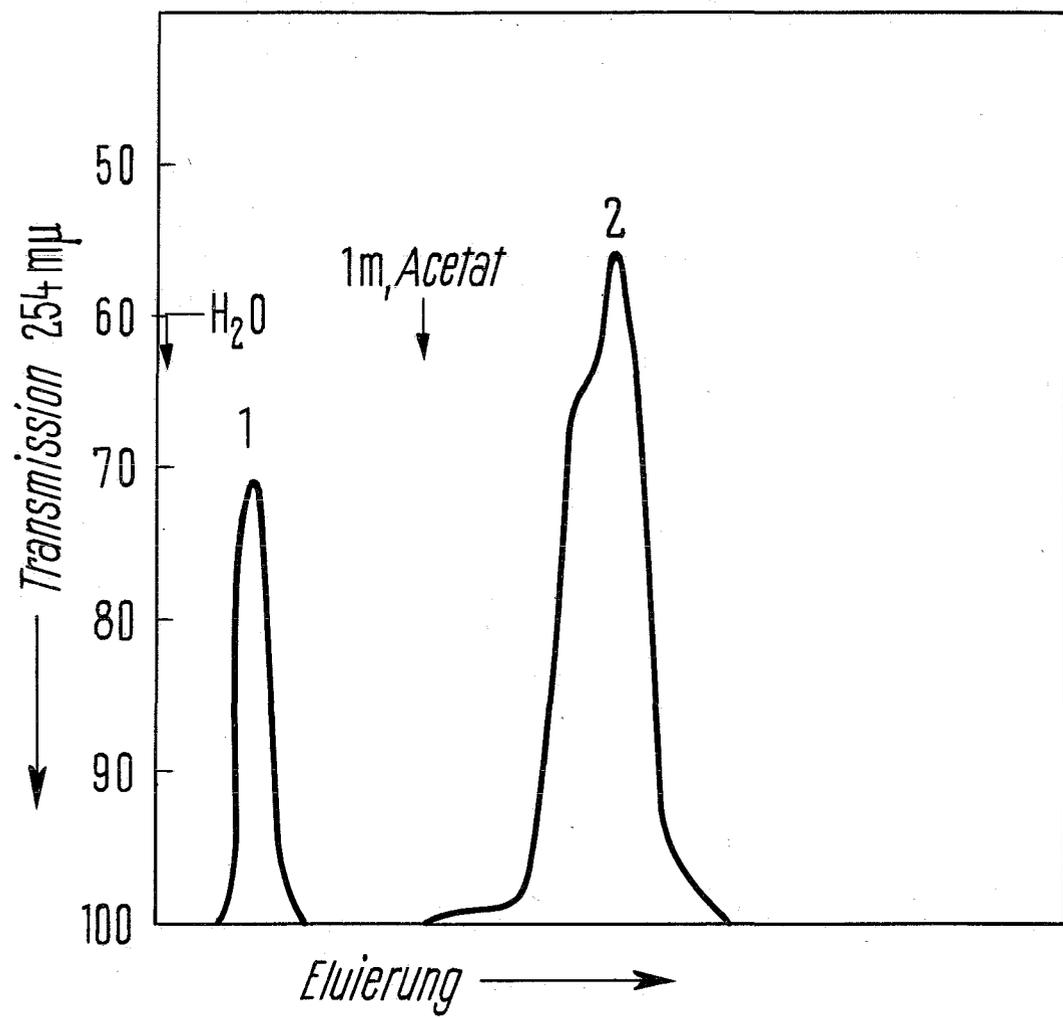


Abb. 9: Chromatographische Auftrennung zweier Aliquote (je ca. 3 OD 271 m μ) des Peak III über DEAE-Sephadex A 25. Säule: 1,45 x 8 cm. Elutionsgradient: 250 ml linearer NaCl Gradient (0 - 0,20 molar) in 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris Puffer pH 7,6.

- oben, (9_a): Kontrolle.

Durchflußrate: 41 ml·h⁻¹. Fraktionsvolumen: 5,1 ml.

- unten, (9_b): nach Monophosphoesterase-Behandlung.

Durchflußrate: 40 ml·h⁻¹. Fraktionsvolumen: 4,8 ml.

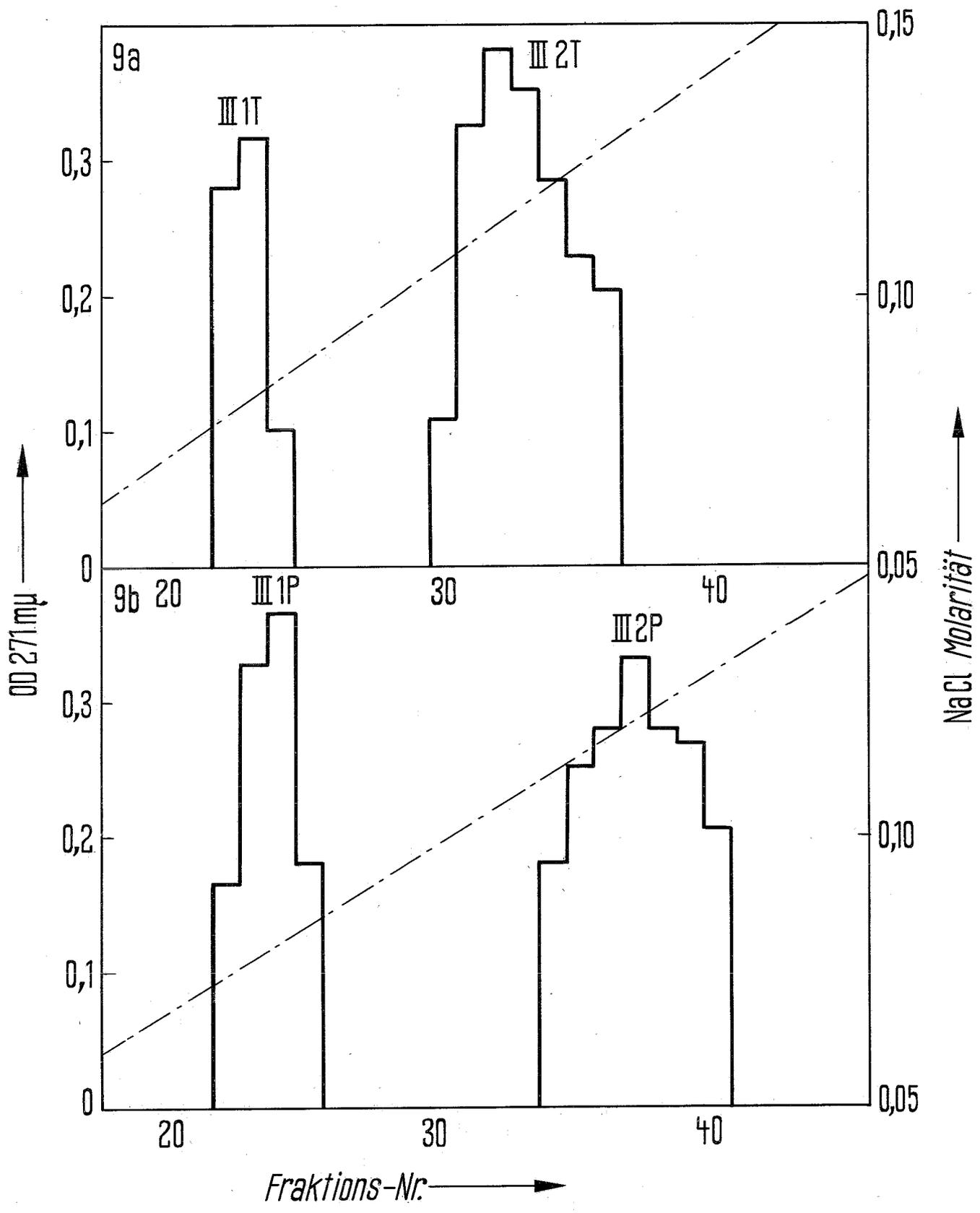


Abb. 10: Chromatographische Auftrennung zweier Aliquote
(je ca. 10 OD 271 m μ) des Peak IV nach 1 m NH₄OH
Inkubation, 30 Minuten bei 37 °C über DEAE-Sepha-
dex A 25. Säule: 0,6 x 10 cm. Elutionsgradient:
250 ml linearer NaCl Gradient (0,05 - 0,25 molar)
in 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris Puffer pH 7,6.

- oben, (10_a) Alkalische Inkubation
wie oben beschrieben.

Durchflußrate: 34 ml·h⁻¹. Fraktionsvolumen: 3,38 ml.

- unten, (10_b) Monophosphoesterase-Behand-
lung nach der alkalischen
Inkubation.

Durchflußrate: 35 ml·h⁻¹. Fraktionsvolumen: 3,48 ml.

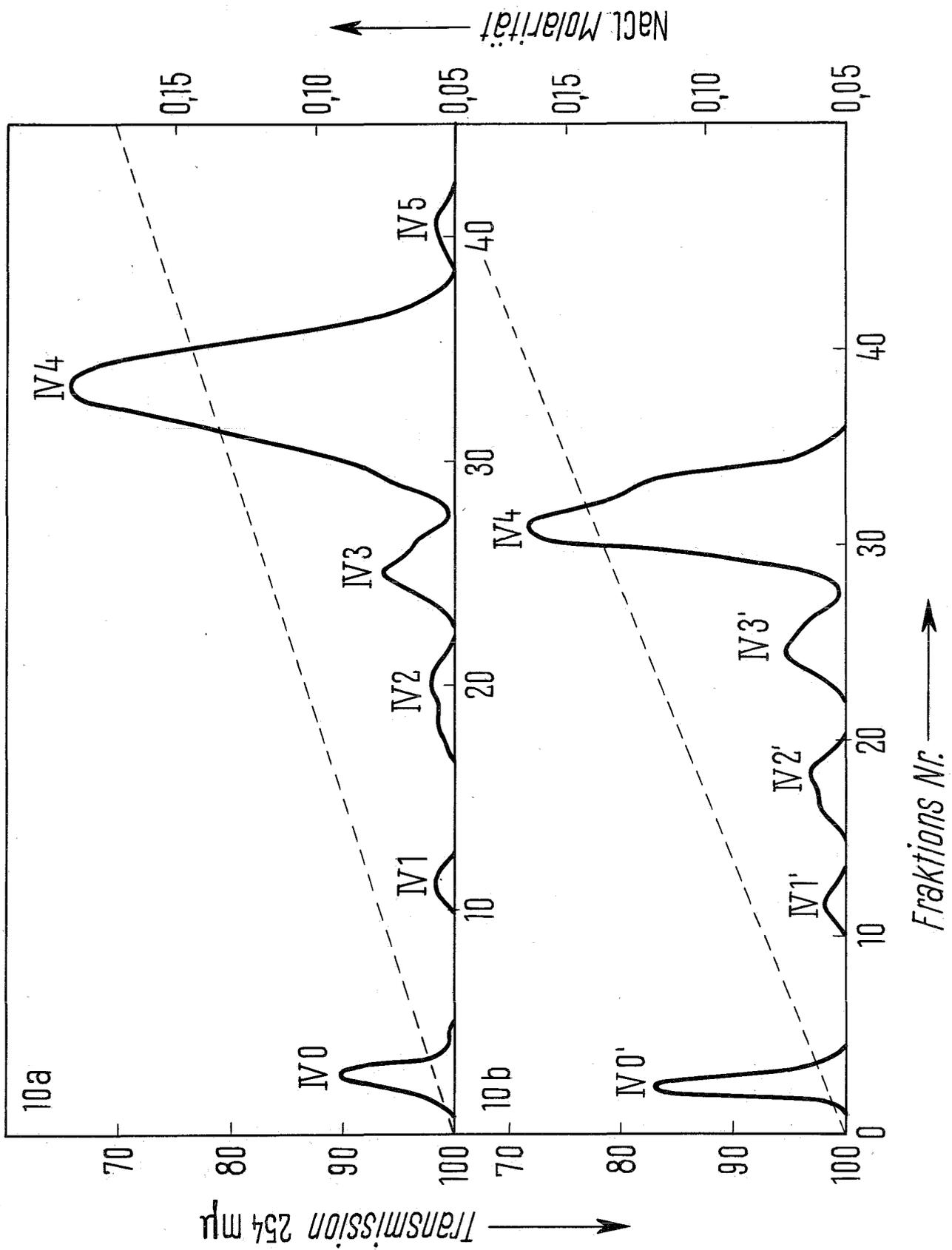


Abb. 11 Chromatographische Auftrennung von ca. 6 OD 271 m μ des Peak IV₄ (siehe Abb. 10_a) nach Monophosphoesterase-Behandlung über DEAE-Sephadex A 25. Säule: 0,6 x 6 cm. Elutionsgradient: 100 ml linearer NaCl Gradient (0,05 bis 0,25 molar) in 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris Puffer pH = 7,6
Durchflußrate: 23,6 ml.h⁻¹. Fraktionsvolumen: 3,4 ml.

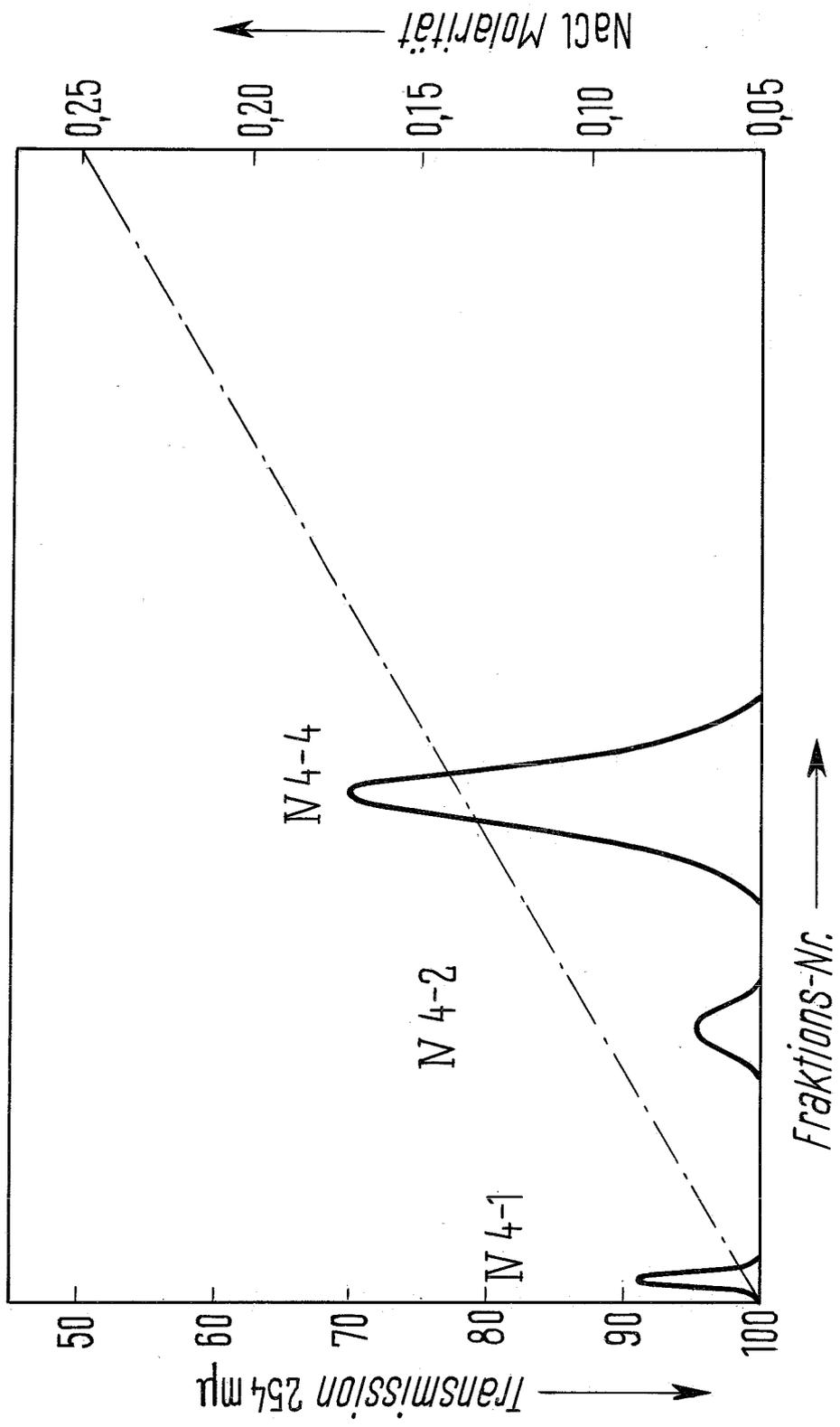


Abb. 12: Verteilung der strahlenbedingten Abbauprodukte der Ladung entsprechend.

- offene Säulen: ohne Alkali-Behandlung

- schraffierte Säulen: nach 1 m NH_4OH Vorinkubation.

Aufgetragen sind die % Angaben die der Gesamt- $\text{OD}_{271\text{m}\mu}$ eluiert in den verschiedenen Fraktionen entsprechen.

Δ : prozentuale Erhöhung nach Alkali Vorinkubation.

N_s : Nukleoside.

B : Basen.

$\Delta N_S = 74\%$	$\Delta I = 125\%$	$\Delta_{II} = 28\%$	$\Delta_{III} = 20\%$	$\Delta_{IV} = 37\%$
---------------------	--------------------	----------------------	-----------------------	----------------------

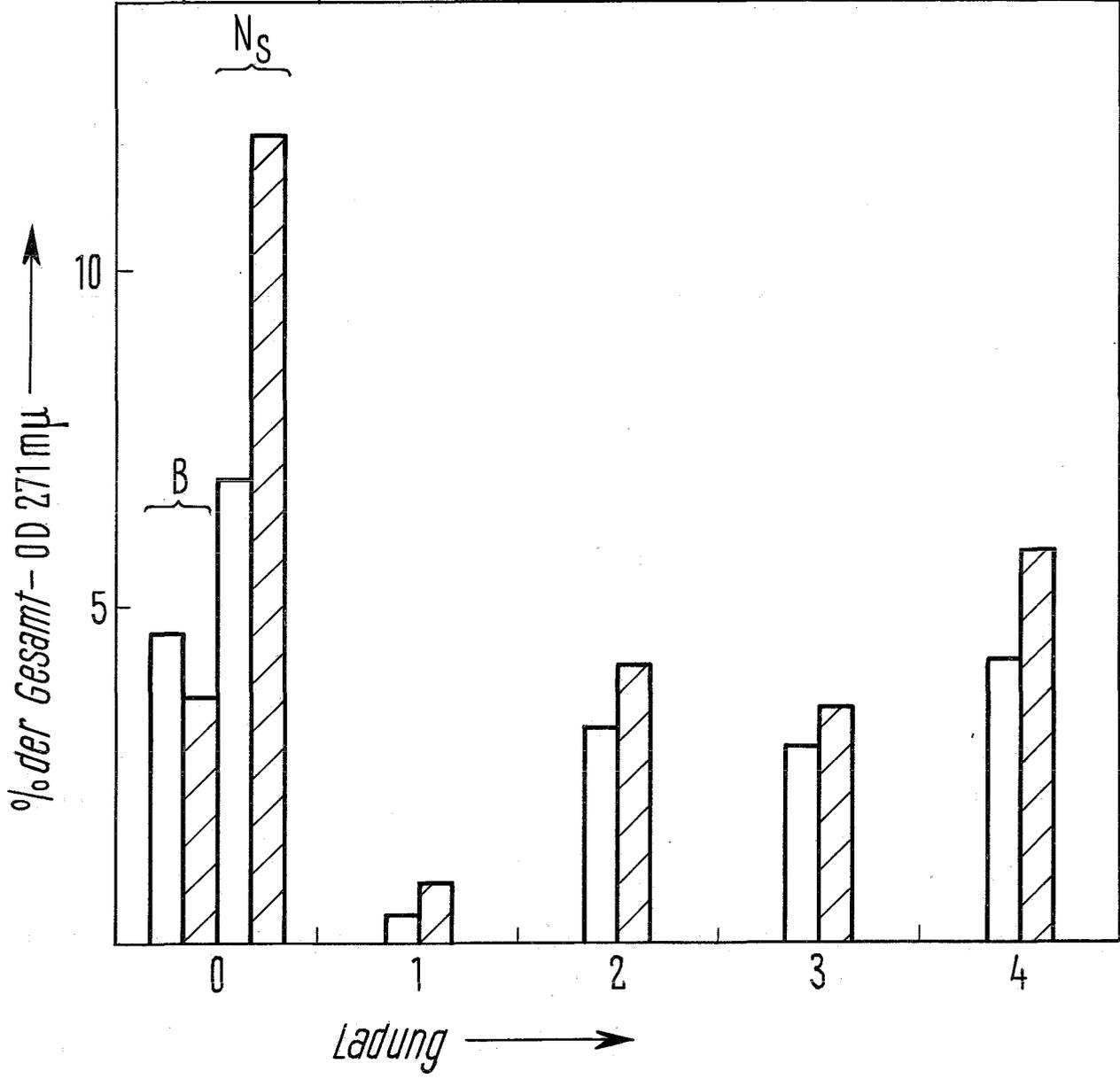


Abb. 13: Auftrennung von ca. 18 OD_{260mμ} Basen über Dowex 50 x 8
(H⁺-Form). Säule: 1,35 x 18 cm.

Eluierungsmittel: 2 n HCl.

Durchflußrate: 46 ml.h⁻¹. Fraktionsvolumen: 6,9 ml.

T : Thymin.

C : Cytosin.

G : Guanin.

A : Adenin.

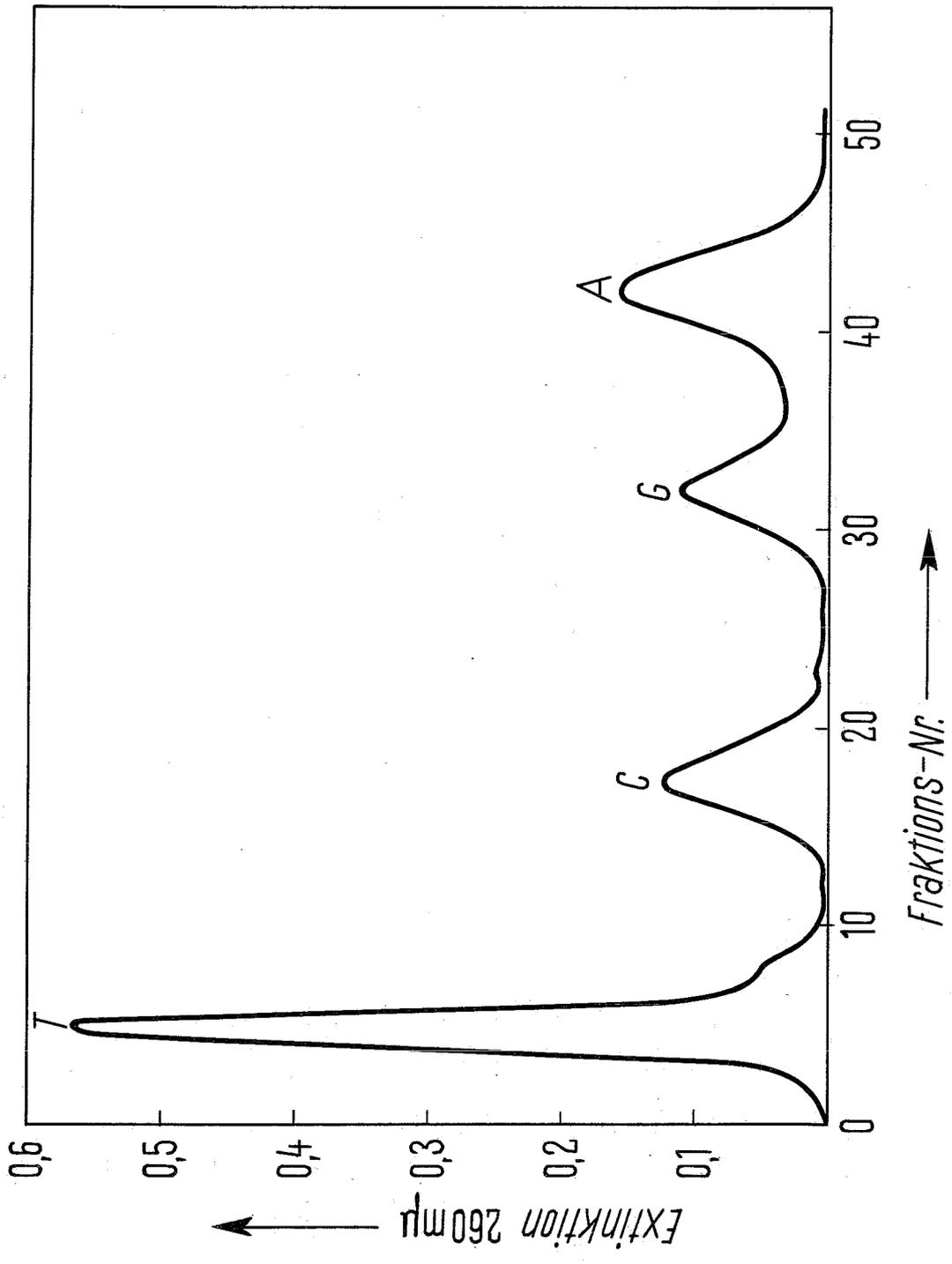


Abb. 14: Auftrennung der Nukleoside über Dowex 1 x 8 (Acetat-Form). Säule: 1,35 x 12 cm.

Die Probe (ca. 18 OD_{260 mμ}) wurde in 7 ml bei pH = 8 auf die Säule gebracht. Der erste Peak wurde mit Wasser eluiert. Er enthält Desoxycytidin und Desoxyadenosin und wurde wieder chromatographisch getrennt. (vergl. Abb. 15).

Durchflußrate: 53 ml.h⁻¹. Fraktionsvolumen: 3,4 ml.

dC : Desoxycytidin.

dA : Desoxyadenosin.

dI : Desoxyinosin.

dT : Desoxythymidin.

dG : Desoxyguanosin.

dX : nicht identifiziert.

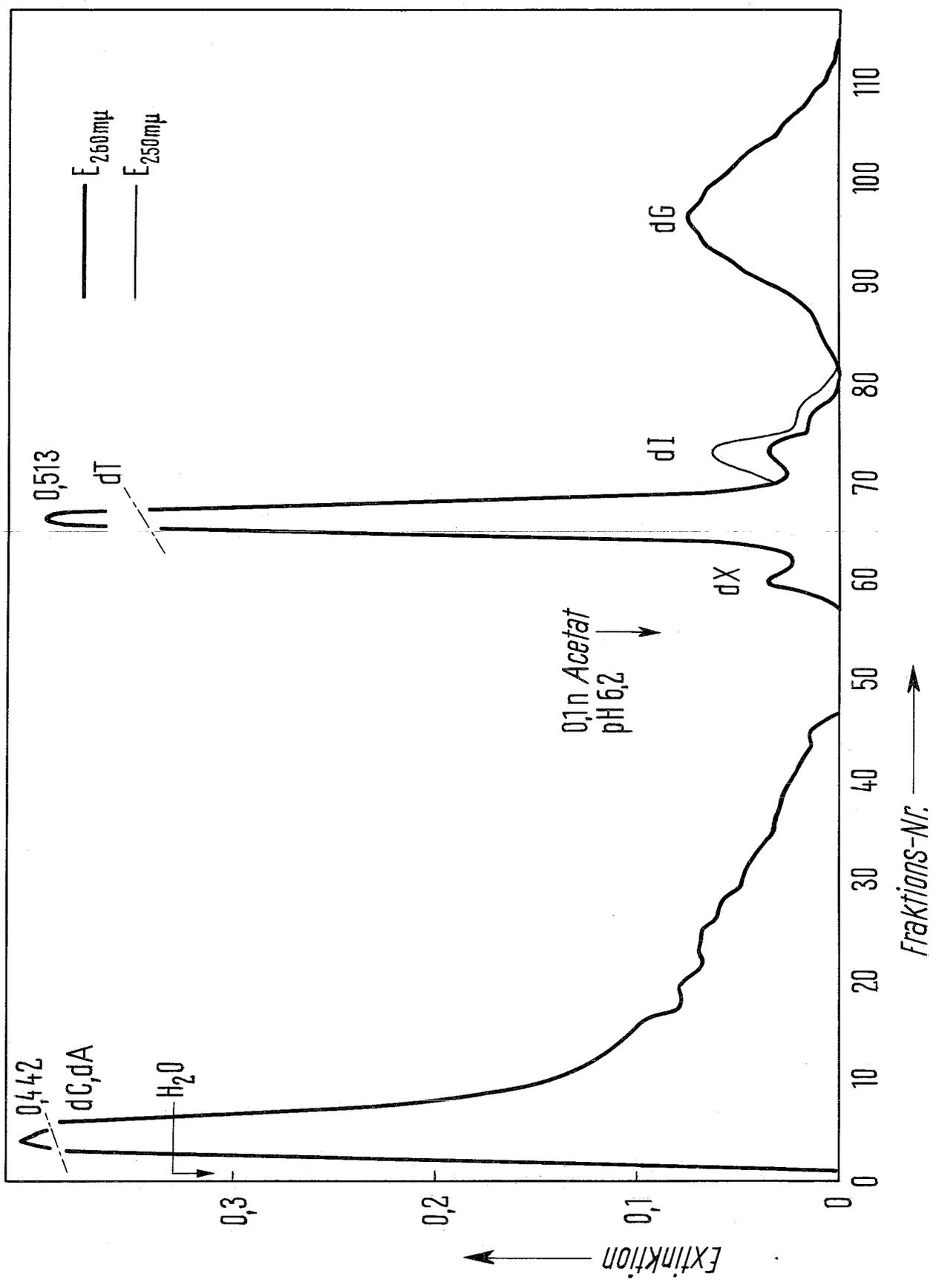


Abb. 15: Trennung des Desoxycytins vom Desoxyadenosin über
Dowex 1 x 8 (Acetat-Form). Säule: 1,35 x 12 cm.
Durchflußrate: 27 ml.h⁻¹. Fraktionsvolumen: 3,4 ml.
(vergl. Abb. 14).

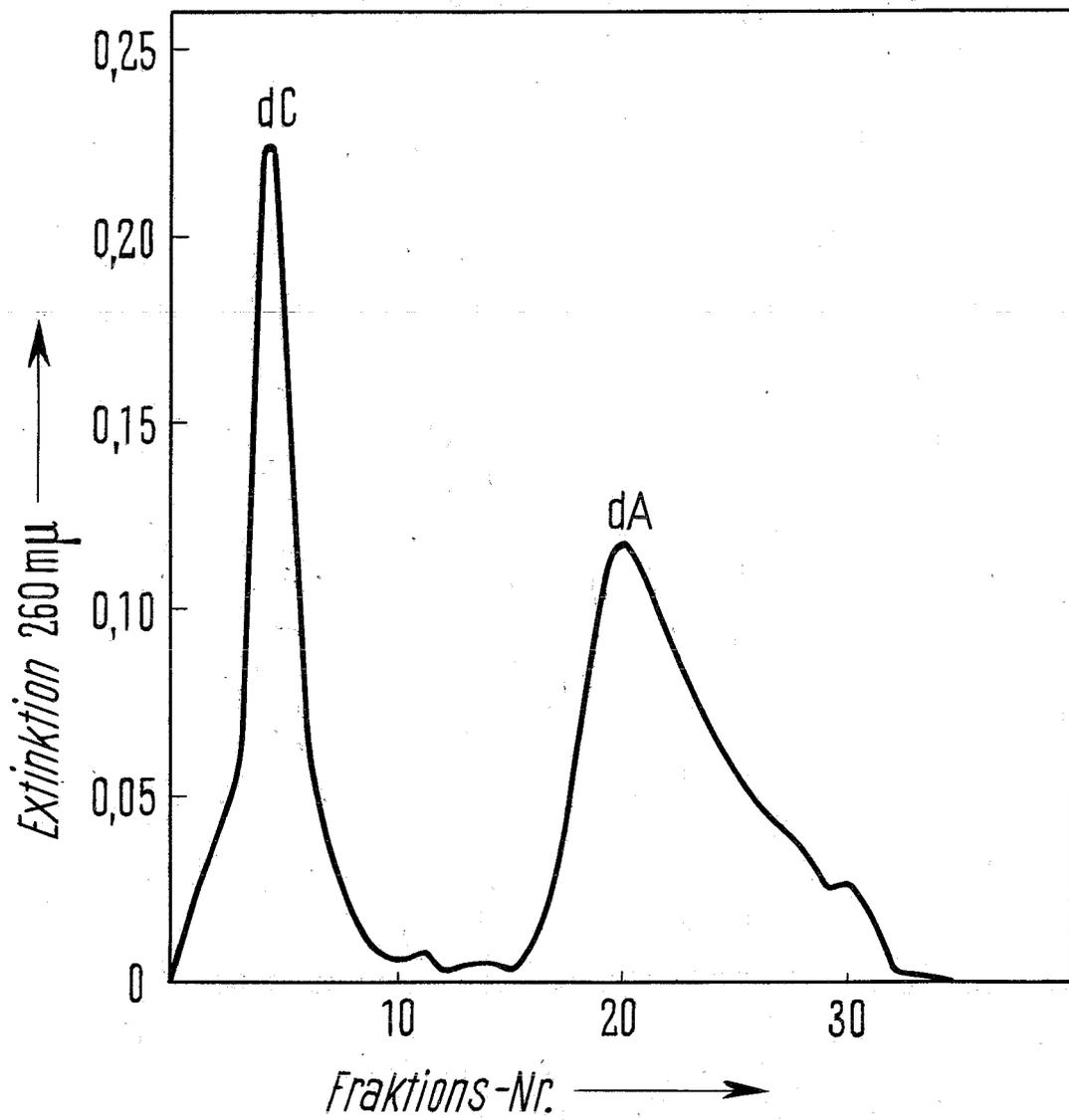


Abb. 16: Rechromatographie von ca. 35 OD_{271 mμ} des Peak IV' nach Inkubation in 0,1 n HCl, 5 Minuten bei 100°C über DEAE-Sephadex A 25. Säule: 1,35 x 15 cm. Elutionsgradient: 1000 ml linearer NaCl Gradient (0 bis 0,30 molar) in 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris Puffer pH = 7,6. Durchflußrate: 46,5 ml.h⁻¹. Fraktionsvolumen: 9,3 ml.

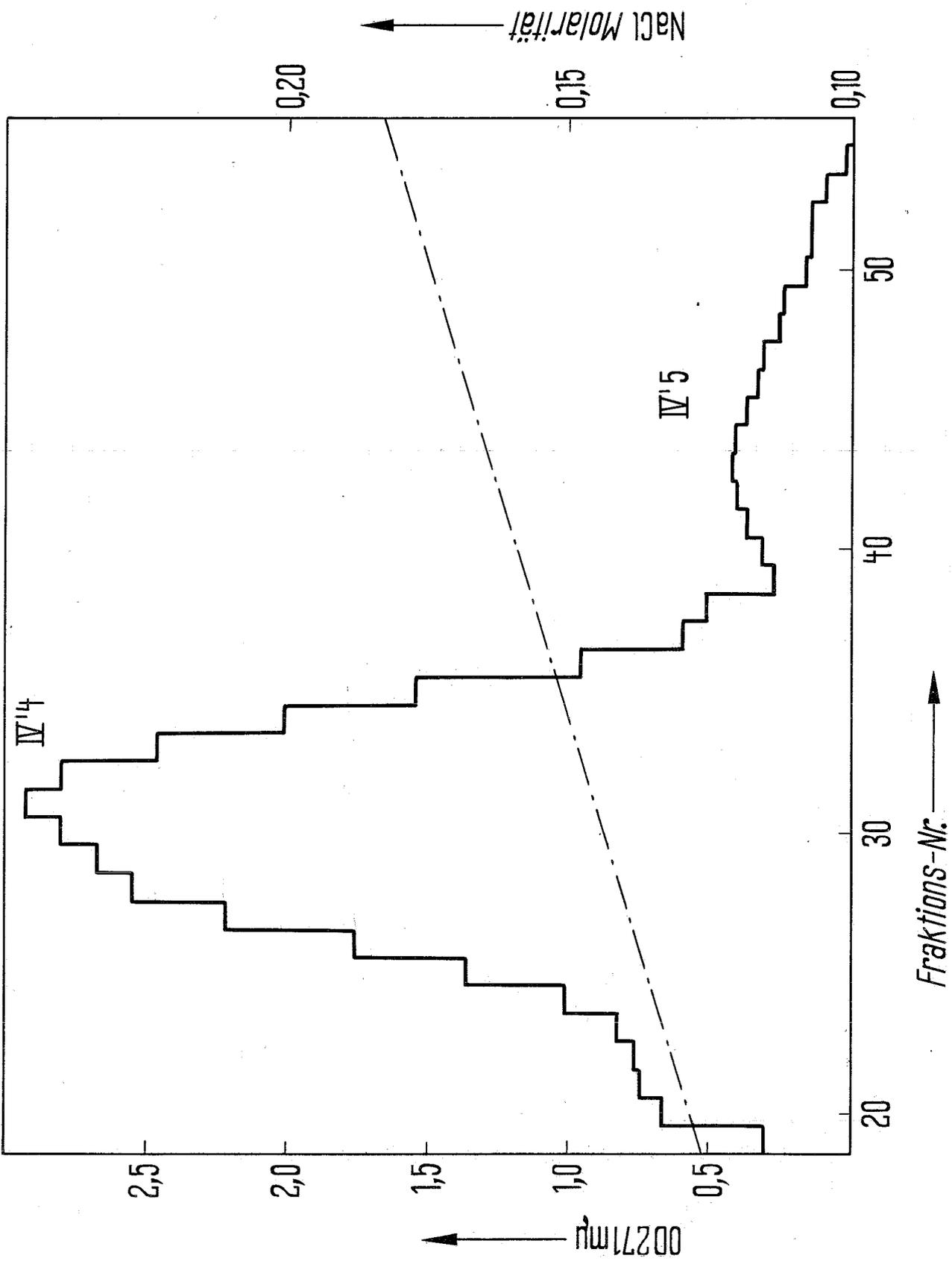


Abb. 17: Rechromatographie von ca. 3 OD_{271 mμ} des Peak IV' 5
nach Monophosphoesterase-Behandlung über DEAE-
Sephadex A 25. Säule 1,35 x 6 cm.
Elutionsgradient: 250 ml linearer NaCl Gradient
(0 bis 0,20 molar) in 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris
Puffer pH = 7,6.
Durchflußrate: ca. 100 ml.h⁻¹. Fraktionsvolumen: 4,8 ml.

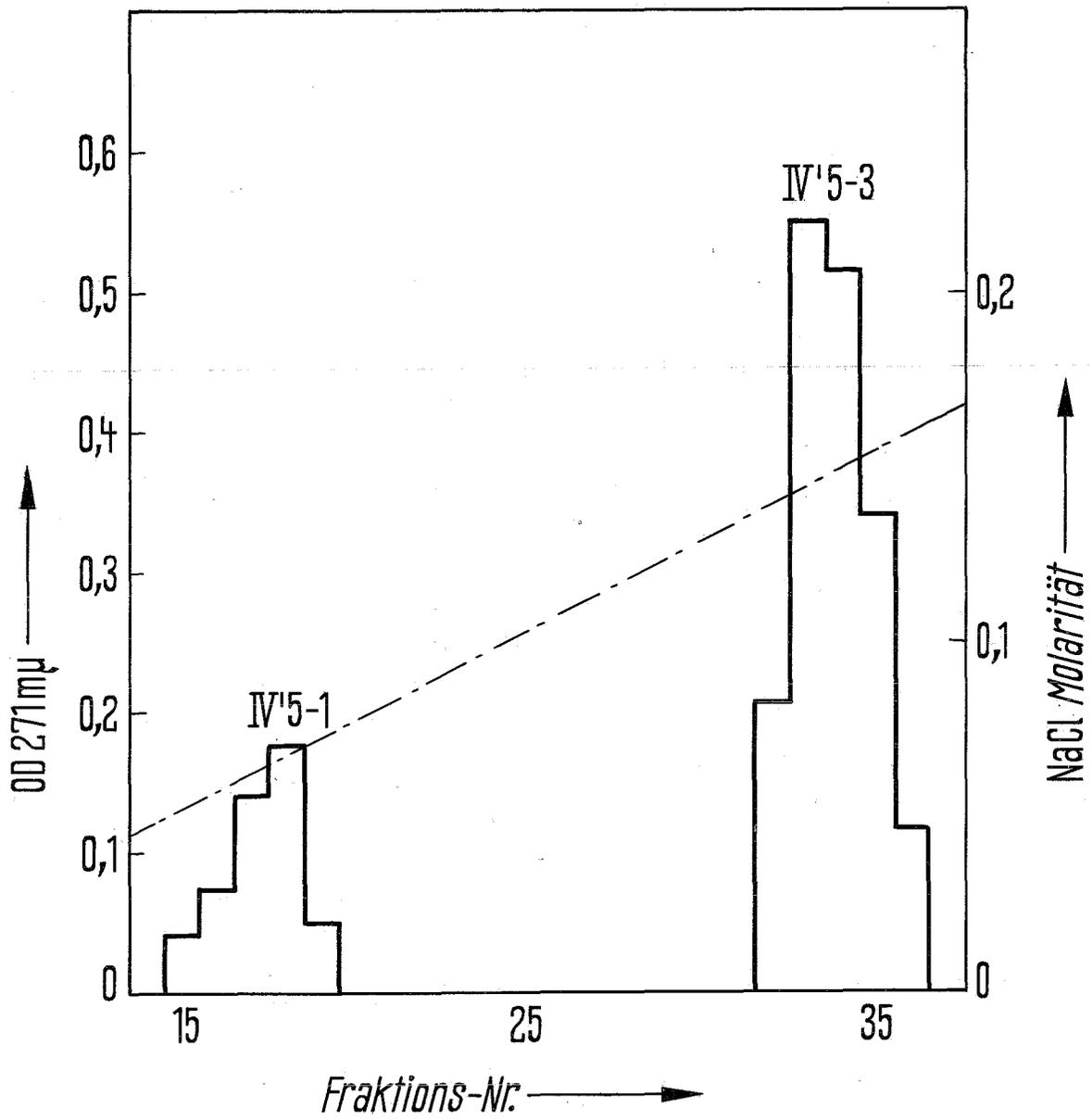


Abb. 18: Rechromatographie von ca. 15 OD_{271 mμ} des Peak IV' 4 nach Monophosphoesterase-Behandlung über DEAE-Sephadex A 25. Säule 1,35 x 15 cm.

Peak IV' 4-0 wurde ohne NaCl eluiert. Peak IV' 4-2 und IV' 4-4 wurden mit 1000 ml linearem NaCl Gradienten (0 bis 0,30 molar) in 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris Puffer pH = 7,6 eluiert.

Durchflußrate: 51,5 ml.h⁻¹. Fraktionsvolumen: 8,6 ml.

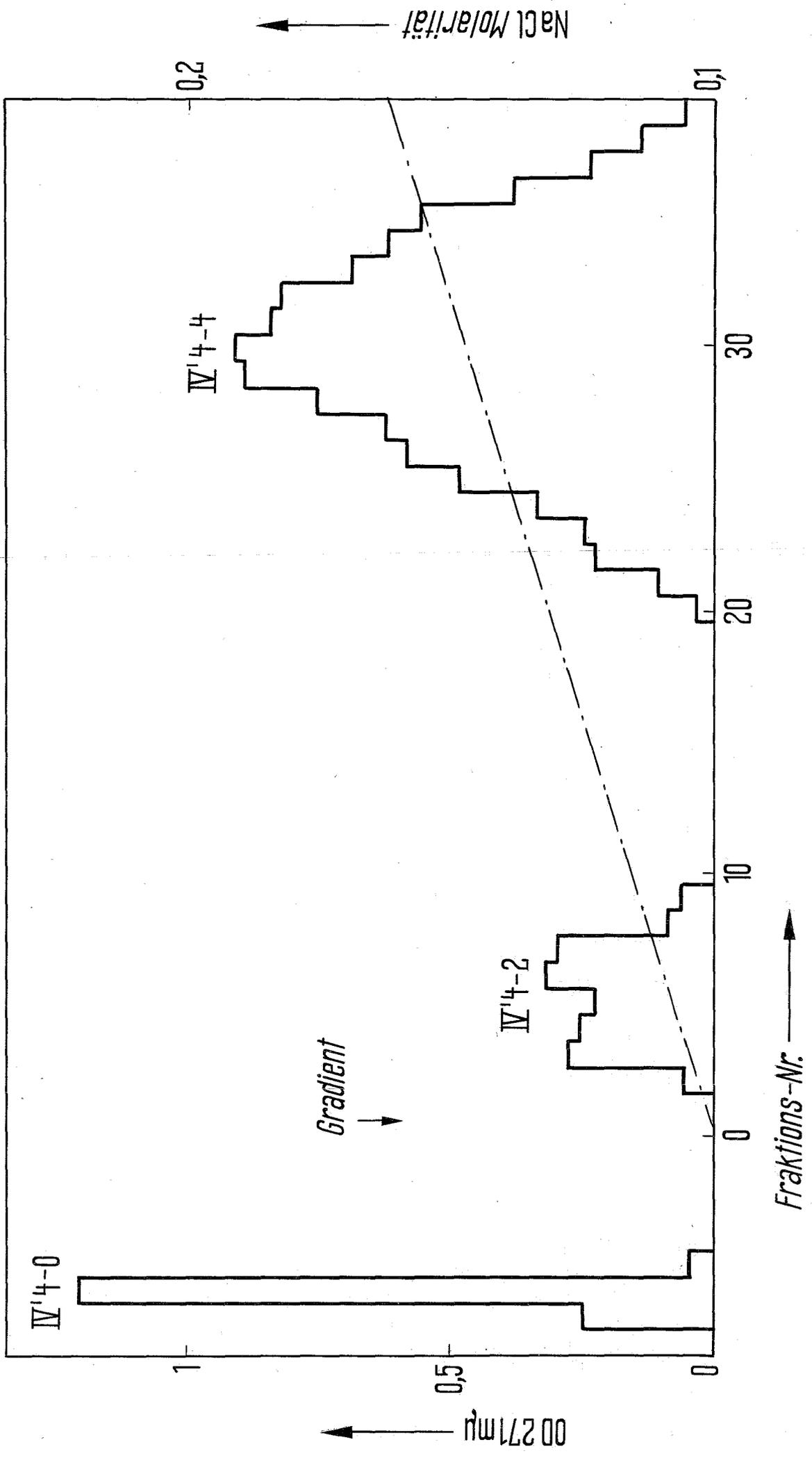


Abb. 19: Phosphat Freisetzung nach alkalische Phosphatase (AP)
Behandlung von unbestrahlter bzw. bestrahlter DNS.

●—————●	unbestrahlt
○-----○	20 kR, AP-
x—————x	20 kR, AP+
Δ—————Δ	50 kR, AP+

