

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

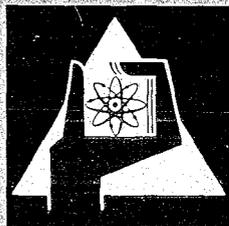
Juli 1969

KFK 993

Institut für Strahlenbiologie

Sauerstoffeffekt an der Desoxyribonukleinsäure
im bestrahlten Nukleoprotein

A. Braun



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Juli 1969

KFK 993

Institut für Strahlenbiologie

Sauerstoffeffekt an der Desoxyribonukleinsäure im
bestrahlten Nukleoprotein

Arnim Braun

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>I. Einleitung</u>	1
<u>II. Material und Methoden</u>	4
1. Isolierung des Desoxyribonucleoproteins	4
2. Charakterisierung des Nukleoproteins	4
3. Das Nukleoprotein als Gel	5
4. Das trockene Nukleoprotein unter Gasbedingungen	5
5. Bestrahlung	6
6. Isolierung der DNS	6
7. Charakterisierung der DNS-Präparationen	7
8. Denaturierung der DNS	7
9. Untersuchungsmethoden zur Bestimmung des Mole- kulargewichtes nativer und denaturierter DNS	8
9.1. Bestimmung der Viskosität $[\eta]$	8
9.2. Bestimmung der Sedimentations- koeffizienten $S^c_{20,w,o,5}$ und Extrapolation auf $S^o_{20,w,o,5}$ bei nativer und denaturierter DNS	9
10. Ermittlung der Heterogenität des Molekular- gewichtes von DNS-Präparationen	10
10.1. Molekulargewichtsbestimmungen aus S^o und $[\eta]$	10
10.2. Berechnung der Sedimentationsverteilung	11
10.3. Berechnung der Molekulargewichtsver- teilung	13
11. Bestimmung der Bruch- und Vernetzungswahr- scheinlichkeit	14

<u>III. Ergebnisse</u>	16
1. Bestrahlungsbedingungen des Nukleoproteins	16
2. Qualität der DNS-Präparate nach Bestrahlung und Isolierung	16
2.1. Proteingehalt	16
2.2. Beziehung zwischen Sedimentation S° und Viskosität $[\eta]$	17
2.3. Sedimentationsverteilung	17
3. Veränderung des Molekulargewichtes nach Bestrahlung	18
3.1. Bruchwahrscheinlichkeit	18
3.2. Vernetzungswahrscheinlichkeit	20
3.3. G-Werte für die einzelnen strahlen- bedingten Ereignisse	21
<u>IV. Diskussion</u>	23
1. Doppelbrüche und Einzelbrüche	23
2. Brüche und Vernetzungen	25
3. Einfluß des Wassergehaltes auf die Strahlen- reaktionen	27
4. Sauerstoffeffekt am Nukleoprotein	29
<u>V. Zusammenfassung</u>	32
<u>VI. Literatur</u>	33
<u>VII. Tabellen und Abbildungen</u>	39

I. Einleitung

Die Beobachtung, daß lymphatische Zellen nach Einwirkung ionisierender Strahlen rasch zugrunde gehen, gab Anlaß dazu, die wichtigsten, durch Strahlen induzierten, molekularen Veränderungen an der Desoxyribonukleinsäurestruktur genauer zu untersuchen. Die Analyse der verschiedenen physikalisch-chemischen Reaktionen an der DNS nach einer Bestrahlung in wässriger Lösung ergab Brüche der Doppelhelix und des Einzelstranges, Vernetzungen der Nukleotidketten, sowie Basenveränderungen und Aufbrechen von Wasserstoffbrücken (WEISS (1964), HAGEN (1967)).

Um die strahlenbedingten Ereignisse an der DNS in der lebenden Zelle besser beschreiben zu können, führte WEINERT (1967) Bestrahlungen der DNS im Nukleoproteingel durch. Dabei wurden nach der Methode von LUZZATI und NICOLAIEFF (1963) Nukleoproteingel mit verschiedenem Wassergehalt hergestellt. Es ergab sich, daß die Bruchwahrscheinlichkeit für Einzel- und Doppelbrüche linear mit der Dosis ansteigt, d.h. jeder Bruch entsteht durch ein einzelnes Absorptionsereignis im Nukleoproteingel. Das Verhältnis der Bruchwahrscheinlichkeit der Einzelkette zu der des Doppelstranges beträgt nach WEINERT und HAGEN (1968) etwa 1:5, es sind somit 10 mal mehr Einzelbrüche in der DNS vorhanden als Doppelbrüche. Aus den Versuchsergebnissen ist deutlich zu erkennen, daß die Empfindlichkeit des Strahlenschadens von der Feuchtigkeit im Nukleoproteingel abhängt. Allerdings fehlen noch entsprechende Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der DNS in trockenem Nukleoprotein, die in der folgenden Arbeit beschrieben werden.

Dabei bot sich Gelegenheit, den Einfluß von Sauerstoff bei der Bestrahlung zu untersuchen. Man weiß aus zahlreichen Untersuchungen der molekularen Strahlenbiologie, daß die Strahlenempfindlichkeit biologischer Makromoleküle in

Gegenwart von Sauerstoff gewöhnlich höher ist, als unter Vakuum (Sauerstoff-Effekt). In verschiedenen Experimenten (von DERTINGER und JUNG (1969) ausführlich beschrieben) mit trockenen Enzymen und Nukleinsäuren zeigte sich nach Bestrahlung ein Sensibilisierungsfaktor zwischen 1,5 und 2 als Quotient zwischen aerober und anaerober Empfindlichkeit. Bestrahlt man die Makromoleküle dagegen in verdünnter wässriger Lösung, so erhält man keine oder nur eine geringe Strahlensensibilisierung; von BRUSTAD (1966) wurde sogar eine Schutzwirkung des Sauerstoffs beschrieben. Es ist daher zunächst verwunderlich, daß in vivo bestrahlte DNS einen Sauerstoff-Effekt von einem Faktor 3 oder mehr ergibt (HUTCHINSON u. ARENA, 1960). Die Zellen müssen somit eine bestimmte Substanz enthalten, die für das Auftreten einer Sauerstoffsensibilisierung verantwortlich ist. So findet man ebenso einen Sauerstoffeffekt, wenn man die DNS in $1,4 \cdot 10^{-3}$ molarem Glutathion bestrahlt. Die sensibilisierende Wirkung des Sauerstoffs in Zellen beruht somit möglicherweise auf seiner Reaktion mit Stoffen, die ähnlich wie Glutathion eine Schutzwirkung zu entfalten vermögen.

Die beschriebene Wirkung des Sauerstoffs ist nach DERTINGER und JUNG (1969) wohl mit der hohen Affinität zu erklären, die er als paramagnetisches Molekül zu den strahlenerzeugten Radikalen besitzt. So kann es zu Peroxyradikalen am Makromolekül kommen ($\dot{M} + O_2 \rightarrow \dot{M}O_2$), wodurch eine Restitution des Makroradikals nach: $M + \dot{H} \rightarrow MH$ verhindert wird. Ebenso reagiert O_2 mit freien Elektronen, was eine Ladungsneutralisation eines ionisierten Makromoleküls nach $MH^+ + e^- \rightarrow MH$ weniger wahrscheinlich macht. Die sensibilisierende Wirkung des Sauerstoffs ist also in diesem Sinne keine primäre Schädigung des Moleküls, sondern eine Verminderung der Restitution.

Bei Bestrahlung in wässriger Lösung müssen andere Reaktionen berücksichtigt werden. Da der Sauerstoff vorwiegend mit H-Radikalen ($O_2 + \dot{H} \rightarrow \dot{H}O_2$) und den hydratisierten Elektronen ($O_2 + e_{aq}^- \rightarrow O_2^-$) reagiert, wird eine Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit des Makromoleküls nicht beobachtet. Unter bestimmten Bedingungen überwiegt sogar der eben beschriebene Radikalfängermechanismus, es kommt dann am Makromolekül zu einer Schutzwirkung des Sauerstoffs (OKSMO und BRUSTAD, 1968).

Wenn der in vivo beobachtete Sauerstoffeffekt an der DNS damit zu erklären ist, daß O_2 mit einem Schutzstoff reagiert, der sich in der Zelle befindet, so war zu prüfen, ob nicht schon der Proteinmantel um die DNS dafür verantwortlich ist und nicht nur in der Zelle vorhandene niedermolekulare Bausteine.

Im Hinblick auf solche Untersuchungen müssen die Ergebnisse an trockener DNS beachtet werden. Unter Sauerstoff wird die Zahl der Doppelbrüche nur wenig beeinflusst, bei den Einzelbrüchen findet sich dagegen ein ausgeprägter O_2 -Effekt (HAGEN u. WELLSTEIN (1965), ALEXANDER u.a. (1961) und LETT u.a. (1961)). Will man die Strahlenempfindlichkeit der DNS im Nukleoprotein untersuchen, so muß man die Funktion des Histonmantels beachten, zumal bei niedriger Dosis die DNS-Struktur nur gering verändert wird. Nach den Messungen von PEACOCKE und PRESTON (1961) sowie LLOYD und PEACOCKE (1963) am Thymus-Nukleoprotein, findet sich nach γ -Bestrahlung eine deutliche Abnahme des Molekulargewichts und des Moleküldurchmessers. LLOYD und PEACOCKE (1968) erklären dies durch zunehmendes Abdissoziieren der Histonmoleküle vom DNS-Strang. Gleichzeitig finden auch Aggregationen der freiwerdenden Histonmoleküle an noch intakte Nukleoproteinketten statt.

In der vorliegenden Arbeit sind wir bemüht, Aussagen über die Strahlenempfindlichkeit der DNS im Nukleoprotein zu machen. Unser besonderes Interesse gilt dabei der Wirkung

ionisierender Strahlen auf trockenes Nukleoprotein im Vakuum, in Sauerstoff und Stickstoff, sowie auf Nukleoproteingel bei einer Feuchtigkeit von 35 %. Dabei wurde die DNS nach der Bestrahlung vom Proteinmantel gelöst und weiter untersucht. Die verwendeten Untersuchungsmethoden wie Viskositäts- und Sedimentationsbestimmungen gestatten uns eine genaue Analyse der Molekulargewichte, sowie der Molekulargewichtsverteilung der DNS, woraus sich dann Bruch- und Vernetzungsereignisse berechnen lassen.

II. Material und Methoden

1. Isolierung des Desoxyribonukleoproteins

Die Isolierung des Nukleoproteins erfolgt durch Umfällung aus handelsüblichem Nukleohiston (Worthington BC). Es wird entsprechend den Angaben der Firma nach ZAMENHOF (1957) isoliert und aus einer 2 M NaCl-Lösung lyophilisiert. Um das anwesende Salz des Handelspräparates zu entfernen, werden etwa 800 mg Nukleohiston in 320 ml 1 M NaCl über Nacht aufgelöst, homogenisiert und mit kaltem aqua dest. auf 0,14 M NaCl gebracht. Die dadurch ausgefällten Nukleoproteinfäden werden in Alkohol gewaschen und mit Aceton und Äther getrocknet. Die jeweilige Ausbeute an gereinigtem Nukleoprotein betrug etwa 50 % der eingewogenen Substanz.

2. Charakterisierung des Nukleoproteins

Nukleoprotein der Fa. Worthington und Nukleoprotein aus Kalbsthymus isoliert, wurden von WEINERT (1967) im Hinblick auf ihre chemische Zusammensetzung miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, daß die Nukleoproteine zu 35 - 40 % aus DNS, zu 45 - 47 % aus Protein und zu etwa 15 % aus Wasser und Salz bestanden. Der Histonanteil machte etwa drei Viertel des Gesamtproteingehaltes aus. Der RNS-Gehalt war beim Worthington-Nukleoprotein < 2 % und konnte vernachlässigt werden.

3. Das Nukleoprotein als Gel

Um das Nukleoprotein in ein Gel zu überführen, muß es mehrere Tage in einer feuchten Kammer gehalten werden. Dazu dient ein Schliffröhrchen, in dem ein kleines Gefäß als Substanzträger des Nukleoproteins eingebracht wird. Zum Nukleoprotein (je 20 mg) werden 0,04 ml aqua dest. gegeben. Um das feuchte Milieu zu erhalten, wird das Röhrchen mit etwas Wasser gefüllt; nach Evakuieren wird Stickstoff eingeleitet und 5 - 10 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Damit wird eine gleichmäßige Durchfeuchtung des Nukleoproteins erreicht. Durch diese Behandlung nehmen im Mittel 20 mg Trockenpräparat $28,19 \pm 0,95$ mg Wasser auf. Unter Berücksichtigung des Wasser- und Salzanteils des Trockenpräparats (etwa 15 %) ergibt sich daraus eine Nukleoproteinkonzentration im Gel von $c = 0,354 \pm 0,0068$.

4. Das trockene Nukleoprotein unter Gasbedingungen

20 mg des mit Aceton und Äther getrockneten Nukleoproteins werden in eine Glasampulle gegeben und über Nacht auf 10^{-2} bis 10^{-3} Torr evakuiert. Dadurch kann man einen minimalen Feuchtigkeitsgehalt des Präparates erreichen, was für unsere Versuche notwendig war. Die schematische Darstellung (Abb. 1) zeigt den Aufbau der benutzten Gasaus-tauschapparatur. Durch ca. 30 Minuten langes Einströmen (h) des Gases (doppelt gereinigter Sauerstoff oder Stickstoff) in den Ölbehälter (a), wird eine hohe Gassättigung erreicht. Der Druckausgleich wird durch eine Brücke zum Ölbehälter (b) hergestellt. Nach Verschuß des Hahnes (d), der die Vakuumpumpe (f) mit den Ampullen (e) verbindet, wird durch langsames Öffnen des Hahnes (c) erreicht, daß das Gas in die evakuierten Ampullen strömt. Es kann nun mit dem Abschmelzen der Ampullen begonnen werden. Da durch die Erwärmung eine Gasausdehnung stattfindet, hat es sich als nützlich erwiesen, den Hahn (c) während des Abschmelz-

vorganges geöffnet zu lassen, damit ein Druckausgleich in den Ölbehälter (a) erfolgen kann. Da die Ampullen nun luftdicht verschlossen sind, können sie längere Zeit aufbewahrt werden. Es empfiehlt sich daher, mehrere Proben auf einmal zu verarbeiten, um möglichst identische Versuchsbedingungen innerhalb einer Versuchsserie zu erhalten. Bei der Versuchsserie des Nukleoproteins im Vakuum werden die Ampullen gleich nach Verschluß des Hahnes (d) abgeschmolzen.

Abb. 1

5. Bestrahlung

Die Bestrahlung der Proben erfolgt im Eisbad mit einer Cobalt- γ -Quelle (Gammacell 220, Atomic Energy of Canada limited). Die Dosisleistung beträgt je nach Bestrahlungszeitpunkt 1,18 - 1,14 Mrad/Stunde.

6. Isolierung der DNS

Eine schonende Isolierung, d.h. Vermeidung von starken Scherkräften und hohen Temperaturen, sowie der Einwirkung von Desoxyribonuklease, ist für die Qualität der DNS von besonderer Bedeutung.

Das unter verschiedenen Versuchsbedingungen bestrahlte Nukleoprotein wird in 9 ml aqua dest. und 1 ml 0,001 M Na-EDTA über Nacht aufgelöst, mit 2 ml 0,5 M Trispuffer (pH 7,8) und 0,5 ml 0,25 % Trypsinlösung versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur stengelassen. Die DNS-Isolierung mit Phenol, modifiziert nach COLTER u.a. (1962) schließt sich an: Die Lösung wird mit 1,25 ml 5 % Desoxycholat und 1:1 mit 75 % Phenol versetzt, 10 Minuten gerührt und 30 Minuten bei 12 000 Upm zentrifugiert. Der klare Überstand wird vorsichtig mit einer weiten Kanüle abgezogen. Das darin gelöste Phenol wird durch drei Ätherextraktionen im Scheidetrichter entfernt und der Äther im Rotationsverdampfer abgesaugt. Die DNS-Lösung wird über

Nacht gegen 0,2 M NaCl (pH 7) bei 4 °C dialysiert.

7. Charakterisierung der DNS-Präparation

Die Ermittlung der Konzentration einer DNS-Lösung erfolgt durch Messung der Absorption bei 260 nm mit dem Spektralphotometer (Zeiss). Dabei wurde mit einem Extinktionskoeffizienten von $22,0 \cdot 10^3 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ gerechnet, der früher aus Phosphatanalysen bestimmt wurde.

Die Bestimmung des Proteingehaltes einer DNS-Präparation erfolgt mit der von LOWRY u.a. (1951) angegebenen Methode. Zu 0,6 ml DNS-Lösung wird 3 ml einer alkalischen Kupfersulfatlösung (50 ml 2 % Na_2CO_3 in 0,1 M NaOH und 1 ml 0,5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ in 1 % Na-tartrat) gegeben, gut durchmischt und 10 Minuten oder länger stehengelassen. 0,3 ml verdünntes Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (1 N) wird schnell zugefügt und innerhalb 1 - 2 Sekunden gemischt. Nach 30 Minuten oder länger wird bei 691 nm photometriert. Den Proteingehalt liest man auf der Eichkurve ab, die mit einer Serum-Albumin-Lösung angefertigt wird.

8. Denaturierung der DNS

Um die in der DNS vorliegenden Einzelbrüche bestimmen zu können, die durch die Analyse des nativen Moleküls nicht erkannt werden, ist es notwendig, die beiden Nukleotidketten schonend voneinander zu trennen. Eine Öffnung der Wasserstoffbindungen ohne gleichzeitige Degradierung der Kette gelingt mit dem Verfahren von DAVISON u.a. (1964).

Es wird:

1 Teil DNS-Lösung mit

1 Teil 0,2 M NaOH gemischt, dann nach 3 Minuten

1 Teil 10 % Formaldehyd (Endkonzentration 2 %) zugegeben,
und gemischt,

mit 0,125 Teilen 1 M KH_2PO_4 neutralisiert,

1 Teil 0,4 M NaCl + 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,3) zugegeben und mit aqua dest. auf insgesamt 5 Teile aufgefüllt.

Um die vollständige Denaturierung der DNS-Probe nachzuprüfen, hat sich der von THOMAS (1954) erstmalig beschriebene "Hyperchrome Effekt" als günstig erwiesen. Danach steigt die Extinktion einer denaturierten DNS um etwa 35 - 40 % bei 260 nm an.

9. Untersuchungsmethoden zur Bestimmung des Molekulargewichtes nativer und denaturierter DNS

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der DNS erfolgt mit hydrodynamischen Methoden. Die native DNS ist dabei in 0,025 M Phosphatpuffer (pH 7,3) und 0,2 M NaCl gelöst.

9.1. Bestimmung der Viskosität $[\eta]$

Die Viskosität der DNS-Präparation in wässriger Lösung wird mit dem Drehviskosimeter nach Hatschek-Couette bei konstanter Temperatur von 20 °C bestimmt. Der Schergradient beträgt $8,4 \text{ sec}^{-1}$, ist also so gering, daß eine Deformation der untersuchten DNS-Moleküle vermieden wird. Aus der Viskosität der Lösung η_L und der Viskosität des reinen Lösungsmittels η_{LM} erhält man die relative Viskosität der Lösung $\eta_{rel} = \eta_L / \eta_{LM}$. Bezieht man η_{rel} auf η_{LM} , so erhält man

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

Das Verhältnis der spezifischen Viskosität zur Konzentration der DNS-Lösung ($\frac{\eta_{sp}}{c}$) wird gegen die Konzentration (c) aufgetragen und auf die Konzentration Null extrapoliert. Man erhält dadurch die Grenzviskosität $[\eta]$ bei unendlicher Verdünnung.

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} \quad [\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}] \quad (2)$$

9.2. Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten

$S^c_{20,w,0,5}$ und -Extrapolation auf $S^0_{20,w,0,5}$
bei nativer und denaturierter DNS

Die Sedimentation der DNS-Moleküle wird in einer 12 mm Aluminium-Doppelsektorzelle einer analytischen Ultrazentrifuge (Modell E, Fa. Beckman Instruments) mit UV-Optik gemessen. Die Konzentration der DNS-Lösung (19 - 21 µg/ml in 0,2 M NaCl und 0,025 M Phosphatpuffer pH 7,3) wird an den einzelnen Orten der Zelle durch Absorptionsmessung bei 265 nm Wellenlänge im Abstand von acht Minuten bestimmt und auf ein photoelektronisches Scannersystem (Typ RS Dynograph, Fa. Beckman Instruments) übertragen. Ein beweglicher Photomultiplier kann schrittweise das Bild der Zelle abfahren (Scanning System), wobei die Lichtabsorption der Lösung in Stromimpulse transformiert wird. Diese werden mit denen des Lösungsmittels aus dem anderen Zellsektor verglichen. Die Differenz wird als Funktionskurve vom Schreiber des Scanningsystems gezeichnet (Abb. 2). Aus dem Abstand $x_{0,5}$ des Gradienten von der Referenzlinie bei 50 % der Konzentration zu verschiedener Zeit t , ergibt sich der mittlere Sedimentationskoeffizient $S^c_{20,w,0,5}$, der nach dem Integralverfahren aus der Gleichung (3) berechnet wird.

Abb. 2

$$S^c_{20,w,0,5} = \frac{2,303 \Delta \log x_{0,5}/\Delta t}{60 \omega^2} \cdot K \quad (3)$$

ω = Winkelgeschwindigkeit

K = Korrekturfaktor, mit dem die Geschwindigkeit des Teilchens im Lösungsmittel auf die im reinen Wasser bei 20 °C korrigiert wird (Indices w und 20). Der Index c bezieht sich auf die verwendete Ausgangskonzentration c der DNS-Lösung. Da die Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten recht gut bekannt ist (vergl. COQUERELLE u.a., 1969), lassen sich die erhaltenen Werte von $S^c_{20,w,0,5}$ auf die Konzentration Null graphisch extra-

polieren. Man erhält dann $S^{\circ}_{20,w,0,5}$.

10. Ermittlung der Heterogenität des Molekulargewichtes von DNS-Präparationen

10.1. Molekulargewichtsbestimmung aus S° und $[\eta]$

Bei Nukleinsäuren hat sich die Bestimmung des mittleren Molekulargewichtes aus S° und $[\eta]$ nach MANDELKERN u.a. (1952) bewährt. Es kann nach der folgenden Gleichung berechnet werden:

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

M = Molekulargewicht

S° = Sedimentation bei unendlicher Verdünnung

$[\eta]$ = Viskosität bei unendlicher Verdünnung

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

\bar{v} = partielles spezifisches Volumen der gelösten
DNS = $0,556 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$

ρ = Dichte des Lösungsmittels = $1,09 \text{ cm}^{-3}$

β = für native DNS = $2,5 \cdot 10^6$

für denaturierte DNS = $2,3 \cdot 10^6$

ein experimenteller Wert, der für native und

denaturierte DNS in einem weiten Molekulargewichtsbereich als konstant gelten kann.

N = Loschmidt'sche Zahl ($6,0235 \cdot 10^{23}$)

Diese Gleichung gilt für native und denaturierte DNS. Man erhält für das Molekulargewicht ($M_{S\eta}$) einen Wert, welcher etwa zwischen dem Zahlenmittel (M_n) und dem Gewichtsmittel (M_w) des polymolekularen Gemisches der DNS-Moleküle liegt.

Es kann aber sowohl die Viskosität $[\eta]$ als auch der Sedimentationskoeffizient allein zur Ermittlung des Molekulargewichtes verwendet werden, vorausgesetzt, daß das gleiche Lösungsmittel verwendet wird. Für die Beziehung zwischen

$[\eta]$ und M gilt die Gleichung

$$[\eta] \text{ in dl/g} = K_{\eta} \cdot M^{a_{\eta}} \quad (5)$$

wobei sich für native DNS aus den Darstellungen von EIGNER und DOTY (1965) $K_{\eta} = 6,9 \cdot 10^{-4}$ und $a_{\eta} = 0,7$ ergibt. Für die denaturierte DNS fanden die gleichen Autoren $K_{\eta} = 3,11 \cdot 10^{-5}$ und $a_{\eta} = 0,912$. Zuverlässigere Werte für das Molekulargewicht erhält man aus den Sedimentationskoeffizienten nach der Gleichung

$$S^{\circ} = K_s \cdot M^{a_s} \quad (6)$$

da die Bestimmungsmethoden für die Sedimentation genauer sind als die für die Viskosität. Für native DNS-Präparationen erhält man nach DOTY u.a. (1958) $K_s = 0,063$ und $a_s = 0,37$. Für denaturierte DNS berechnete WEINERT (1967) $K_s = 0,055$ und $a_s = 0,38$.

10.2. Berechnung der Sedimentationsverteilung

Die Sedimentationsgeschwindigkeit eines Moleküls im Schwerfeld der Zentrifuge wird bestimmt durch die Zentrifugalkraft $F = -mr\omega^2$, die an der Masse (m) der Teilchen ansetzt. Da die untersuchten DNS-Moleküle verschieden groß sind, also verschieden schnell sedimentieren, ist es notwendig, den Gradienten zwischen Lösung und Lösungsmittel in der Zentrifugenzelle näher zu analysieren, um damit Rückschlüsse auf die Größenverteilung der Moleküle in der entsprechenden DNS-Präparation zu ziehen. Abb. 2 zeigt als Beispiel den in der analytischen Ultrazentrifuge mit Scannersystem erhaltenen Gradienten einer unbestrahlten Phagen-DNS-Lösung. Die senkrecht verlaufende Linie beweist, daß die mit gleicher Geschwindigkeit sedimentierenden Moleküle von einheitlicher Größe sind. Nach Degradierung der DNS-Moleküle verbreitert sich der Übergang von Lösung zu Lösungsmittel, man erhält einen S-förmigen Gradient, dessen Verlauf durch den Abstand von der Referenzlinie x und der Höhe über der Grundlinie y , die der Konzentration entspricht,

wiedergegeben wird. Jeder Punkt x_i/y_i des Sedimentationsgradienten entspricht einer bestimmten Konzentration (y_i) von Molekülen, die nach einer gewissen Zeit den Abstand (x_i) von der Referenzlinie hat. Um eine Sedimentationsverteilung aufzustellen, muß zu jedem x_i -Wert der zugehörige y_i -Wert ausgemessen werden. Die x_i -Werte werden nach dem üblichen Verfahren mit der Gleichung (3) in S_i^c -Werte umgerechnet. Nach Einführen der die Sektorform der Zelle berücksichtigenden Verdünnungskorrektur wurde y_i in den relativen Massenanteil c_i umgewandelt. Daraus läßt sich nach SCHUMAKER und SCHACHMANN (1957) und HAGEN (1967) die integrale Verteilungskurve der Sedimentation S_i^c und c_i berechnen. Um eine Verteilung der S_i^o -Werte zu erhalten, muß jede Sedimentation S_i^c auf die DNS-Konzentration ($c = 0$) extrapoliert werden nach der Gleichung:

$$S_i^o = S_i^c \left[1 + k'_s [\eta]_i \cdot K_z \cdot \left(0,5 + \frac{c_i}{2} \right) \right] \quad (7)$$

K_z = Ausgangskonzentration der DNS-Lösung in g/100 ml

k'_s = eine von EIGNER u.a. (1962) definierte Konstante für die Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentation = 0,80

c_i = relative Konzentration am Gradienten
Der Faktor $\left(0,5 + \frac{c_i}{2} \right)$ bedeutet eine Korrektur, welche die während der fortschreitenden Sedimentation stetige Verdünnung der DNS-Lösung von K_z auf $K_z \cdot c_i$ berücksichtigt.

$[\eta]_i$ = der zu jedem S_i^c gehörende Wert der Grenzviskosität $[\eta]_i$, der nach der Gleichung:

$$[\eta]_i = a (S_i^o)^b \quad (8)$$

erhalten wird. Diese Beziehung wurde von EIGNER und DOTY (1965) an Hand von Literaturdaten verschiedener DNS-Präparationen ermittelt und ist in der Abb. 3 als Mittelwertskurve aufgezeichnet. Die in dieser Arbeit untersuchten

nativen DNS-Proben sind mit den Symbolen der unterschiedlichen Versuchsbedingungen vermerkt.

Das Gleichungssystem (7) und (8) wurde numerisch durch Iteration gelöst. COQUERELLE u.a. (1969) zeigten, daß die aus den einzelnen S_i^c -Werten berechneten S_i^o -Werte eine gute Übereinstimmung mit der Verteilung der S^o -Werte ergaben, die durch eine graphische Extrapolation nach dem Verfahren von CANTOW (1959) ermittelt wurden.

Abb. 3

10.3. Berechnung der Molekulargewichtsverteilung

Gleichung (6) gestattet es, die in der Sedimentationsverteilung gefundenen Werte (S_i^o) in die zugehörigen Molekulargewichte M_i umzuwandeln und somit eine Molekulargewichtsverteilung M_i gegen c_i zu berechnen. Zur Charakterisierung einer solchen Verteilung kann das Gewichtsmittel (M_w) und Zahlenmittel (M_n) verwendet werden:

$$M_w = \sum_{i=1}^n (c_i - c_{i-1}) \frac{M_i + M_{i-1}}{2} \quad (9)$$

$$M_n = 1 / \sum_{i=1}^n \frac{(c_i - c_{i-1})^2}{(M_i + M_{i-1})} \quad (10)$$

Die Berechnung aller Werte, ausgehend von den Meßpunkten des Gradienten x_i und y_i wurde mit einem Fortran-IV-Programm in der elektronischen Rechenmaschine IBM 7074 durchgeführt. Einzelheiten des Rechenvorganges sind bei COQUERELLE u.a. (1969) beschrieben. Zur Auswertung der einzelnen DNS-Proben werden aus jedem Sedimentationslauf zwei Aufnahmen herangezogen.

Dieses Verfahren gestattet uns eine genaue Analyse des polymolekularen Gemisches und erlaubt sowohl eine Degradierung als auch eine Vernetzung der DNS-Moleküle zu messen.

11. Berechnung der Bruch- und Vernetzungswahrscheinlichkeit

Durch den Einfluß ionisierender Strahlen auf die DNS entstehen Brüche sowie Vernetzungen in der Nukleotidkette. Eine Analyse dieser molekularen Veränderungen ist mit Hilfe des Gewichts- und Zahlenmittels des Molekulargewichtes möglich. Es ergibt sich daraus die Bruchwahrscheinlichkeit A (im Doppelstrang pro Nukleotidpaar) und α (im Einzelstrang pro Nukleotid) sowie die Vernetzungswahrscheinlichkeit Ω (im Doppelstrang pro Nukleotidpaar) und ω (für den Einzelstrang pro Nukleotid). Brüche der Einzelkette entstehen linear mit der Dosis:

$$\alpha = p D \quad (11)$$

(p : Bruchwahrscheinlichkeit pro Nukleotid und rad).

Die Beziehung der Doppelbrüche zur Dosis wird am besten durch eine lineare und eine quadratische Komponente beschrieben (BOHNE, 1968)

$$A = B D + C D^2 \quad (12)$$

wobei die Komponenten B und C von den jeweiligen Bestrahlungsbedingungen abhängen (siehe Diskussion).

Nach den Angaben von HENGLEIN und SCHNABEL (1966) kann angenommen werden, daß die Vernetzungswahrscheinlichkeit linear mit der Dosis steigt.

$$\Omega = Q \cdot D \quad (13.1)$$

$$\omega = q \cdot D \quad (13.2)$$

(Q : Vernetzungswahrscheinlichkeit pro Nukleotidpaar und rad; q : Vernetzungswahrscheinlichkeit pro Nukleotid und rad)

Ereignen sich neben den Brüchen auch Vernetzungen, so ist der reziproke Wert der mittleren Kettenlänge $\frac{1}{P_n}$ um $\frac{\Omega}{2}$ kleiner (CHARLESBY, 1960).

Aus M_n und M_{n_0} ergibt sich dann:

$$A - \frac{\Omega}{2} = \left(\frac{1}{M_n} - \frac{1}{M_{n_0}} \right) m \quad (14)$$

Da das Gewichtsmittel M_w durch Vernetzungen stärker beeinflusst wird als durch Brüche, gilt nach CHARLESBY (1960)

$$\frac{A}{2} - \Omega = \left(\frac{1}{M_w} - \frac{1}{M_{w_0}} \right) m \quad (15)$$

M_{w_0} und M_{n_0} sind Mittelwerte aus unbestrahlten DNS-Proben.

m : durchschnittliches Gewicht eines Monomers. Für Thymus-DNS ist das beim Doppelstrang ein Nukleotidpaar mit $m = 617,2$ und beim Einzelstrang ein Nukleotid mit $m = 308,6$.

Aus den Gleichungen (14) und (15) folgt durch Substitution:

$$A = \left(\frac{2}{M_n} - \frac{1}{M_w} - K_A \right) \frac{m}{1,5} \quad (16)$$

$$\text{wobei } K_A = \frac{2}{M_{n_0}} - \frac{1}{M_{w_0}}$$

$$\Omega = \left(\frac{1}{M_n} - \frac{2}{M_w} + K_\Omega \right) \frac{m}{1,5} \quad (17)$$

$$\text{wobei } K_\Omega = \frac{2}{M_{w_0}} - \frac{1}{M_{n_0}}$$

Die Beziehung von A und Ω zur Dosis ergibt sich aus der Gleichung (12) und (13). Diese Gleichungen sind allerdings nur gültig, wenn die Brüche und Vernetzungen statistisch verteilt sind, was jedoch für die strahlenbedingten Ereignisse zunächst angenommen werden kann.

III. Ergebnisse

1. Bestrahlungsbedingungen des Nukleoproteins

Die Nukleoproteine werden im Dosisbereich von 1 - 16 Mrad bestrahlt, die DNS isoliert und wie beschrieben analysiert. Zunächst wurde die Strahlenempfindlichkeit der DNS im Nukleoproteingel mit einem Wassergehalt von 65 % bestimmt (Versuchsserie A) und mit dem im trockenen Nukleoprotein verglichen. Dabei befand sich das Nukleoprotein im Vakuum (Versuchsserie B). Weitere Aussagen über die Empfindlichkeit der DNS im trockenen Nukleoprotein konnten nach Bestrahlung in Gegenwart von Sauerstoff oder Stickstoff gemacht werden (Versuchsserie C und D). Am Anfang und Ende jeder Bestrahlungsserie wurden zwei Kontrollen hergestellt, um einen besseren Überblick über die möglichen Streuungen der Meßwerte während der Versuchsserie zu erhalten.

2. Qualität der DNS-Präparate nach Bestrahlung und Isolierung

2.1. Proteingehalt

Um die DNS aus der Histonhülle zu lösen, bedarf es neben der Behandlung mit Phenol auch proteolytischer Fermente (DOUNCE u.a., 1966). Dieser Schritt ist von besonderer Bedeutung, da eine Verunreinigung der DNS-Lösung durch Proteine zu Ungenauigkeiten der Versuchsergebnisse führt. Der Proteingehalt unserer DNS-Präparationen liegt zwischen 1,17 und 7,89 %, wobei zu beachten ist, daß die aus dem bestrahlten Nukleoproteingel isolierten Lösungen die höheren Werte (3,01 - 7,89 %) ergeben. Für die DNS-Lösungen aus trockener Substanz wurden Proteinmengen von 1,17 - 5,6% gemessen. Die Bestimmung des RNS-Gehaltes in unseren DNS-Lösungen erübrigte sich, da nach WEINERT und HAGEN (1968) der RNS-Gehalt im Worthington-Nukleoprotein nur sehr geringe Werte (< 2 %) ergab.

2.2. Beziehung zwischen Sedimentation S^0 und Viskosität $[\eta]$

Hinsichtlich der Beziehung zwischen Sedimentation S^0 und Viskosität $[\eta]$ passen unsere Versuchsergebnisse in das von EIGNER und DOTY (1965) aus zahlreichen DNS-Präparationen aufgestellte System (Abb. 3). Es fällt auf, daß die Werte des Nukleoproteingels im doppeltlogarithmischen Koordinatensystem einer flacheren Kurve zugeordnet sind, als EIGNER und DOTY (1965) angeben. Die Werte der Bestrahlungsserie C unter O_2 liegen unter der Mittelwertkurve, die der Serie B und D, besonders nach hohen Dosen darüber. Dieser Befund soll später noch erörtert werden.

Abb. 3

Die unbestrahlten nativen Proben (Tab. 1 - 4) ergeben im Mittel einen S^0 -Wert von etwa 20 und eine Viskosität $[\eta]$ von 5200, die Werte liegen somit etwas unter der empirisch ermittelten Beziehung von EIGNER und DOTY (1965).

2.3. Sedimentationsverteilung

Die durch Auswerten der Gradienten in der analytischen Ultrazentrifuge ermittelten Sedimentationsdiagramme gestatten uns, Hinweise für das Vorliegen von Vernetzungen zu erhalten. Beim Vergleich der Abb. 4 und 5 ist bei nativer DNS nach Bestrahlung im Vakuum und unter Stickstoff zu erkennen, daß Fraktionen erscheinen, die schneller als die Kontrolle wandern, also größer geworden sind. Dies kann nur durch Vernetzungen geschehen sein (Abb. 4). Dieser Effekt konnte bei DNS im trockenen Nukleoprotein unter Sauerstoff, sowie bei DNS im Nukleoproteingel nicht beobachtet werden (Abb. 5).

Abb. 4 und 5

Die links der Kontrolle liegenden Sedimentationslinien sind auf eine Degradierung der DNS-Moleküle zurückzuführen. Ebenso sind auch nach der Denaturierung der bestrahlten DNS keine Fraktionen nachzuweisen, die schneller als die Kontrolle wandern (Abb. 6). Eine genaue Aussage über mögliche Vernetzungen gestattet uns allerdings erst die Molekulargewichtsverteilung.

Abb. 6

3. Veränderung des Molekulargewichtes nach Bestrahlung

Die Tabellen 1 - 8 zeigen unter anderem die Abhängigkeit des Molekulargewichtes nativer und denaturierter DNS von der Strahlendosis. Betrachtet man bei nativer DNS die nach Gleichung (4) bestimmten $M_{s\eta}$ -Werte, so zeigt sich mit steigender Strahlendosis bei allen Proben eine deutliche Abnahme des Molekulargewichtes. Dies ist bei der DNS des Nukleoproteingels (Tab. 1 u. 5) schon bei geringer Dosis am auffälligsten. Bei der DNS im trockenen Nukleoprotein sind dagegen Dosen bis zu 16 Mrad erforderlich, um einen guten Meßbereich zur Molekulargewichtsbestimmung zu erhalten. Ein wesentlicher Unterschied zwischen aerober und anaerober Empfindlichkeit ist hierbei gut zu erkennen.

Tab. 1 - 8

3.1. Bruchwahrscheinlichkeit

Eine genaue Analyse der strahlenbedingten Ereignisse ist nur mit Hilfe der Molekulargewichtsverteilung möglich. Die von uns nach Gleichung (9) und (10) berechneten Werte für Gewichtsmittel (M_w) und Zahlenmittel (M_n) pro Dosis sind für native DNS in Tabelle 1 - 4 und für denaturierte DNS in Tabelle 5 - 8 aufgeführt. Es wird jeweils der Mittelwert angegeben, der sich aus zwei Sedimentationsverteilungen bei Untersuchung einer Präparation ergibt. Wie oben angeführt, lassen sich M_w und M_n zur Charakterisierung der Molekulargewichtsverteilung verwenden, ferner kann aus

ihnen die Bruch- und Vernetzungswahrscheinlichkeit berechnet werden. Wir betrachten zunächst die Bruchwahrscheinlichkeit der Doppelhelix A, die sich bei der Analyse der nativen DNS ergibt, sowie die des Einzelstranges α , die bei der Analyse der denaturierten DNS erhalten wird.

Abb. 7 zeigt die Bruchwahrscheinlichkeit (A) und (α) der DNS im feuchten Nukleoprotein (65 % H₂O) in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Aus dem Verlauf der Kurve für Doppelbrüche ist gemäß Gleichung (12) eine exponentielle Kinetik ersichtlich, obwohl man einen linearen Anstieg, d.h. einen durch ein einzelnes Absorptionsereignis entstehender Schaden, bis 1,5 Mrad nicht ausschließen kann. Bei der denaturierten DNS ist im Diagramm eine leichte Abweichung vom linearen Anstieg der Bruchwahrscheinlichkeit α zu erkennen. Eine Regressionsanalyse zeigt, daß die beste Anpassung durch die Beziehung $\alpha = 16,29 \cdot 10^{-10} D + 3,31 \cdot 10^{-16} D^2$ erhalten wird.

Abb. 7

Analysiert man die Bruchwahrscheinlichkeit der DNS im trockenen Nukleoprotein nach Bestrahlung, so zeigt sich sowohl bei nativer als auch denaturierter DNS mit zunehmender Dosis ein linearer Anstieg.

Abb. 8 und 9

Besonders auffällig ist eine erhöhte Bruchrate bei Bestrahlung unter Sauerstoff. Aus der Steigung der Kurven ergibt sich für die Doppelbrüche ein Verhältnis der Strahlenempfindlichkeit im Vakuum, in Stickstoff und im Sauerstoff von 1 : 1,55 : 8. Bei der Bruchwahrscheinlichkeit der Einzelkette war der Sauerstoffeffekt nicht ganz so ausgeprägt. Wir ermittelten ein Verhältnis der Empfindlichkeit im Vakuum, in Stickstoff und im Sauerstoff von 1 : 1,14 : 4,46. Bei allen Proben konnten wir somit eine geringe Erhöhung der Bruchwahrscheinlichkeit im Stickstoff gegenüber Vakuum feststellen.

3.2. Vernetzungswahrscheinlichkeit

Liegt das Molekulargewicht der im Nukleoprotein bestrahlten DNS über dem der Kontrolle, so kann man annehmen, daß intermolekulare Vernetzungen stattgefunden haben. Da mit zunehmender Masse des Moleküls auch die Sedimentation im Schwerfeld der Zentrifuge steigt, war es möglich, anhand der Ergebnisse von Sedimentationsdiagrammen (vergl. Abb. 4 und 5) Vernetzungen wahrscheinlich zu machen. Wie im methodischen Teil beschrieben, ist eine genauere Ermittlung der Vernetzungswahrscheinlichkeit mit Hilfe der Gleichungen (13.1) und (13.2) möglich. Die Vernetzungsrate an den Doppelsträngen pro Nukleotidpaar wurde oben mit Ω , die an den Einzelsträngen pro Nukleotid mit ω definiert. In der Tabelle 1 - 4 sind unsere Versuchsergebnisse für Ω , in Tabelle 5 - 8 für ω angegeben. Bei den Vernetzungen zeigt sich ähnlich wie bei den Brüchen, daß die Feuchtigkeit des Nukleoproteingels, sowie unterschiedliche Gasbedingungen bei trockenem Nukleoprotein, die Vernetzungswahrscheinlichkeit wesentlich beeinflussen. Die Abb. 10 stellt die aus den Meßdaten des Nukleoproteingels ermittelten Dosiseffektkurven der Vernetzungswahrscheinlichkeit Ω und ω dar. Native Proben zeigen bis 2 Mrad kaum Vernetzungen, bei höheren Dosen findet man einen exponentiellen Verlauf. Die durch Regressionsanalyse ermittelte Neigung der Einzelstrangvernetzungen ergibt eine deutliche Abweichung vom linearen Anstieg. Die Meßpunkte passen sich am besten einer Kurve nach $\omega = 2,82 \cdot 10^{-10} D + 2,14 \cdot 10^{-16} D^2$ an.

Abb. 10

Die Vernetzungsereignisse im trockenen Nukleoprotein steigen sowohl bei nativer als auch bei denaturierter DNS linear mit der Dosis (Abb. 11 und 12). Die Ergebnisse zeigen ebenfalls einen ausgeprägten Sauerstoffeffekt, wie man aus der Neigung der entsprechenden Regressionsgeraden ermitteln kann. Es ergibt sich für native DNS ein

Verhältnis der Strahlenempfindlichkeit im Vakuum, Stickstoff und Sauerstoff von 1 : 1,4 : 3,7. Bei denaturierter DNS beträgt es 1 : 1,7 : 5,2.

Abb. 11 und 12

3.3. G-Werte für die einzelnen strahlenbedingten Ereignisse

Bei den trocken bestrahlten Proben (Versuchsserie B, C, D) hatten wir einen linearen Anstieg der Bruch- und Vernetzungsrates beobachtet, wie das auch nach den Gleichungen (11), (13.1) und (13.2) zu erwarten war. Insbesondere ergab sich auch bei den Doppelbrüchen ein linearer Anstieg mit der Dosis (Abb. 8), d.h. die quadratische Komponente der Gleichung (12) ist zu vernachlässigen, $A = B \cdot D$. Aus den Bruch- und Vernetzungsraten können wir nun die Bruch- und Vernetzungswahrscheinlichkeit pro rad berechnen, die sich einfach aus der Steigung der Geraden ergibt. Um eine Übersicht über die Streuung der Meßdaten zu gewinnen, haben wir B , p , Q und q für jeden einzelnen Meßwert gesondert berechnet, diese Werte gemittelt und den Fehler dieses

Mittelwertes $\sigma_M = \sqrt{\frac{\sum \Delta^2}{n(n-1)}}$ bestimmt. Die entsprechenden Werte finden sich in Tabelle 9.

Bei der Bestrahlung des Nukleoproteingels ergeben sich gekrümmte Dosiseffektcurven, insbesondere bei den Ereignissen am Doppelstrang (Abb. 7 und 10). Um die Bruch- und Vernetzungswahrscheinlichkeit pro rad zu erhalten, haben wir deshalb die Anfangssteigung graphisch bestimmt und diese zur weiteren Berechnung von B , Q , p und q herangezogen.

Tab. 9

Will man die G-Werte, d.h. die Zahl der durch Strahlenschäden hervorgerufenen Ereignisse pro 100 eV absorbiertes Energie bestimmen, so ist es zunächst notwendig, die Zahl der Nukleotidpaare bzw. Nukleotide pro g Nukleoprotein zu berechnen

$$\frac{\text{Monomer}}{g} = \frac{N \cdot d}{m}$$

N = Loschmidt'sche Zahl = $6,023 \cdot 10^{23}$

d = Anteil der DNS im Nukleoprotein

= 0,39 im Trockenpräparat (WEINERT, 1967)

= 0,166 im feuchten Gel (65 % H₂O)

m = durchschnittliches Gewicht eines Monomers (vergl. Gleichung (15))

Es ergaben sich im trockenen Nukleoprotein $3,89 \cdot 10^{20}$ Nukleotidpaare/g Nukleoprotein und $7,78 \cdot 10^{20}$ Nukleotide/g Nukleoprotein. Beim feuchten Nukleoprotein betragen die entsprechenden Werte $1,55 \cdot 10^{20}$ und $3,24 \cdot 10^{20}$. Die strahlenbedingten Doppelbrüche pro g Nukleoprotein erhält man nun, wenn die Zahl der Nukleotidpaare/g Nukleoprotein mit der Bruchwahrscheinlichkeit pro rad multipliziert werden. Einzelstrangbrüche, sowie Vernetzungen pro g können auf diese Art ebenfalls bestimmt werden. Da der G-Wert definitionsgemäß 1 ist, wenn $6,2 \cdot 10^{11}$ Ereignisse pro g und rad eintreten, kann somit der für unsere Proben charakteristische G-Wert berechnet werden (Tab. 9).

Das folgende Zahlenbeispiel zeigt, nach unseren Versuchsergebnissen (Serie B), die Berechnung des G-Wertes für Einzelbrüche im Vakuum. Da der Anteil der DNS im trockenen Nukleoprotein mit 0,39 angegeben wurde und das durchschnittliche Gewichtsmittel eines Nukleotids im Einzelstrang der Thymus-DNS 308,6 beträgt, ergibt sich wie oben beschrieben:

$$\frac{\text{Nukleotid}}{\text{g}} = \frac{6,023 \cdot 10^{23} \cdot 0,39}{308,6} = 7,58 \cdot 10^{20} ;$$

$$\text{Einzelbrüche pro g} = 7,58 \cdot 10^{20} \cdot p$$

(p = Brüche pro rad und Nukleotid = $3,62 \cdot 10^{-10}$
(siehe Tab. 9))

$$= 7,58 \cdot 10^{20} \cdot 3,62 \cdot 10^{-10} = 27,5 \cdot 10^{10} ;$$

$$G = \frac{2,75 \cdot 10^{11}}{6,2 \cdot 10^{11}} = 0,444$$

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung ionisierender Strahlen auf die molekulare Struktur der DNS untersucht. Dabei prüften wir die Strahlenempfindlichkeit von Thymus-DNS im feuchten und trockenen Nukleoprotein, um zu sehen, inwieweit die Proteinhülle für den primären Strahlenschaden an der Nukleinsäure von Bedeutung ist. Unser besonderes Interesse galt der unterschiedlichen Sensibilisierung der DNS im trockenen Nukleoprotein nach Bestrahlung im Vakuum und in Gegenwart von Sauerstoff. Als strahlenbedingte molekulare Veränderungen ließen sich Brüche der Doppelhelix und des Einzelstranges, sowie Vernetzungen mit Hilfe von Sedimentationsbestimmungen im Schwerfeld der analytischen Ultrazentrifuge als auch mit Viskositätsmessungen bestimmen.

1. Doppelbrüche und Einzelbrüche

Bei der Bestrahlung von trockenem Nukleoprotein ergab sich ein linearer Anstieg der Bruchraten A und α , es konnte deshalb die Bruchwahrscheinlichkeit B und p pro rad berechnet werden, somit das Verhältnis von Doppelbrüchen zu Einzelbrüchen. Bei der Bestrahlung des feuchten Nukleoproteingels ergaben sich gekrümmte Kurven, aus der Anfangs-

neigung dieser Kurven lassen sich jedoch Werte für B und p ermitteln. Das Verhältnis der Einzelbrüche zu den Doppelbrüchen (G_p/G_B) ergibt sich aus folgender Aufstellung, wobei einige Literaturdaten mit berücksichtigt sind:

Präparat	G_p/G_B	Autor
trockenes Nukleoprotein, Vakuum	22,3	diese Arbeit
" " N ₂	21,4	" "
" " O ₂	14,1	" "
Nukleoproteingel, c=0,53 in N ₂	9,2	Weinert u. Hagen, 1968
" c=0,35 "	11,0	diese Arbeit
" c=0,20 "	12,3	Weinert u. Hagen, 1968
T1-DNS im Phagen in 10 ⁻³ _m Histidin	12,0	Bohne u.a. 1969
trockene DNS, in Vakuum	5,7	Hagen u. Wellstein, 1965
" " in Luft	12,6	" "
" " in O ₂	21,2	" "

Wir können allgemein mit einem Verhältnis von 10:1 rechnen, wenn vorzugsweise die Brüche durch direkte Strahlenwirkung erzeugt werden und die DNS als Gel vorliegt. Dies ist auch unter den Bedingungen einer Bestrahlung in vivo wahrscheinlich. Dieses Verhältnis liegt wohl in der Geometrie des DNS-Moleküls zugrunde. Während Einzelbrüche durch jede Primärionisation, auch solchen mit einer Ionisation, erzeugt werden, entstehen vermutlich Doppelbrüche nur, wenn der DNS-Strang durch eine Primärionisation getroffen wird, die mehr als eine Einzelionisation haben und ihre Energie in der Nähe der beiden Stränge absorbieren. Bei der Bestrahlung von trockenem Nukleoprotein wird die Energie, die im Proteinmantel absorbiert wird, nicht weitergeleitet. Es entstehen Doppelbrüche nur dann, wenn die Primärionisation direkt im Doppelstrang der DNS absorbiert wird. Wird jedoch das feuchte Nukleoprotein bestrahlt, so wird möglicherweise die im Protein absorbierte Energie an die DNS-Kette weiter-

geleitet und es ist häufiger als beim Trockenpräparat, daß beide DNS-Stränge geschädigt werden. Im Verhältnis zu den Einzelbrüchen finden sich dann mehr Doppelbrüche, d.h. p/B wird kleiner, es nimmt von 20 auf 10 ab. Die Befunde von HAGEN und WELLSTEIN (1965) können nicht mit Sicherheit interpretiert werden, da der hohe Anteil von Vernetzungen keine genaue Bestimmung der Doppelbrüche zuließ.

2. Brüche und Vernetzungen

Hinweise auf das Vorliegen von Vernetzungen zwischen den DNS-Molekülen nach der Bestrahlung des Nukleoproteingels ergeben sich von drei Seiten: aus der Konfiguration der DNS-Moleküle, aus der Sedimentationsverteilung sowie aus den berechneten Werten für die Vernetzungswahrscheinlichkeit Q und q . Um die molekulare Konfiguration der isolierten DNS-Moleküle zu beurteilen, kann man bei jeder DNS-Präparation S° mit $[\eta]$ vergleichen und in ein Diagramm eintragen (Abb. 3). Von EIGNER und DOTY (1965) wurde aus dem Vergleich zahlreicher DNS-Proben eine Beziehung zwischen S° und $[\eta]$ aufgestellt, die für DNS-Moleküle verschiedener Größe in einer Salzlösung von 0,1 - 1 M Na^+ gilt. Im Verhältnis zu dieser Mittelwertskurve, die in Abb. 3 eingezeichnet ist, liegen unsere Proben, die im Vakuum oder im N_2 bestrahlt wurden, deutlich darüber und die, die in O_2 bestrahlt wurden, darunter. Die Stickstoff- oder Vakuumproben haben also im Verhältnis zur Viskosität einen höheren Sedimentationskoeffizienten als die Sauerstoffproben. Das deutet ganz allgemein auf das Vorliegen von Vernetzungen hin.

Weiter werden diese Vernetzungen auch bei dem Vergleich der Sedimentationsverteilungen (Abb. 4 und 5) deutlich. Bei den Stickstoff- und Vakuum-Proben zeigen sich nach Bestrahlung Molekülfraktionen, die größer als die unbestrahlten Moleküle sind, während solche Fraktionen bei Be-

strahlung unter O_2 fehlten. Schließlich kann man aus den G-Werten (Tabelle 9) das Verhältnis zwischen Vernetzungen zu Brüchen am Doppelstrang Q/B berechnen. Zusammen mit einigen Daten aus der Literatur ergeben sich folgende Werte:

Präparat	G_Q/G_B	Autor
trockenes Nukleoprotein, Vakuum	0,508	diese Arbeit
" " N_2	0,468	" "
" " O_2	0,232	" "
Nukleoproteingel, $c=0,35$ in N_2	0,333	" "
T1-DNS im Phagen in 10^{-3} m Histidin	0,209	Bohne u.a. 1969
trockene DNS, Vakuum	3,35	Hagen u. Wellstein, 1965
" " O_2	1,0	" "
DNS-Gel, $c = 0,33$	0,5	Lett u. Alexander, 1961

Auffallend ist das deutliche Absinken der Vernetzungen unter O_2 , sowohl beim trockenen Nukleoprotein als auch bei trockener DNS. Die eingangs entwickelten Vorstellungen über eine Verhinderung von Vernetzungen durch Peroxyradikale (vergl. DERTINGER u. JUNG, 1969) werden damit bestätigt.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen fanden WEINERT u. HAGEN (1968) keine Vernetzungen an den DNS-Molekülen im Nukleoproteingel. Es ist möglich, daß dies mit der verwendeten Methode zusammenhängt. Während in dieser Arbeit mit dem Scanning-System der analytischen Ultrazentrifuge gearbeitet wurde, wurde dort die Konzentrationsverteilung in der Zentrifugenzelle mit dem photographischen Film gemessen, wobei sehr kleine Bruchstücke nicht erkannt werden konnten. Dadurch liegen die Werte für M_n höher, während M_w fast unverändert bleibt. Entsprechend ergeben sich dann bei der Berechnung nach Gleichung (17) keine Vernetzungen.

Am Einzelstrang war jedoch das Verhältnis q/p unter den verschiedenen Bestrahlungsbedingungen etwa gleich (0,3), doch ist möglich, daß die bei der Denaturierung der DNS nicht vermeidbare Alkalibehandlung zu Spaltungen der Vernetzungen führt. Solange wir keine Informationen über die Chemie der Vernetzungen haben, kann darüber nichts ausgesagt werden.

3. Einfluß des Wassergehaltes auf die Strahlenreaktionen

Wie aus dem Vergleich der Versuchsserie D (Bestrahlung in Stickstoff) und der Versuchsserie A (Bestrahlung als Gel mit 65 % Wasser) hervorgeht (siehe auch Tab. 9), steigt die Strahlenempfindlichkeit der DNS bei der Zugabe von Wasser erheblich an. Zudem ändert sich die Form der Dosis-effektkurve. Aus dem linearen Anstieg wird, insbesondere bei den Ereignissen am Doppelstrang, eine gekrümmte Kurve, die neben einer linearen Komponente auch eine quadratische besitzt. Ähnliche Beobachtungen wurden früher schon für die Doppelbrüche an der DNS in wässriger Lösung gemacht. Hierbei kommt es nur zu Doppelbrüchen, wenn zwei Einzelbrüche gegenüberliegen oder im Abstand von nicht mehr als 3 Nukleotidpaaren (HAGEN, 1967). Es ist wahrscheinlich, daß im Nukleoproteingel neben Doppelbrüchen durch direkte Energieabsorption auch Doppelbrüche durch benachbarte Einzelbrüche entstehen. Dadurch kommt es zu dem starken Anstieg der Werte für A im oberen Dosisbereich. Bestimmt man jedoch jeweils die Anfangssteigung, so lassen sich Werte für die Bruch- und Vernetzungswahrscheinlichkeit (B und Q) pro rad ermitteln, die sich mit denen von den linearen Dosiseffektkurven bei der Bestrahlung des trockenen Nukleoproteins vergleichen lassen.

Im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Feuchtigkeit steht möglicherweise auch die stets gering erhöhte Empfindlichkeit der DNS nach Bestrahlung im Stickstoff gegenüber Vakuum. Auf Grund der Versuchsanordnung (Abb. 1) könnte es

möglich sein, daß mit dem Einleiten von Stickstoff in die Ampullen im Schlauchsystem zwischen dem Hahn (c) und dem Pumpstand (g) eine geringe Verunreinigung an Feuchtigkeit eindringt.

Zusammen mit den Werten von WEINERT und HAGEN (1968) können wir somit eine Reihe verschiedener Bestrahlungsbedingungen mit zunehmender Feuchtigkeit aufstellen und die G-Werte für B, p und Q vergleichen.

Bestrahlungs- bedingung	G für	B	p	Q	Autor
Vakuum		0,0185	0,444	0,0097	diese Arbeit
Stickstoff		0,0288	0,619	0,0135	" "
Gel, c = 0,53		0,0220	0,202	-	Weinert u. Hagen
" c = 0,35		0,0377	0,415	0,0125	diese Arbeit
" c = 0,20		0,0310	0,381	-	Weinert u. Hagen

Berücksichtigt man, daß von WEINERT und HAGEN (1968) keine Vernetzungen gefunden wurden und deshalb auch zu geringe Bruchraten errechnet werden, so sind im ganzen recht ähnliche Werte für die einzelnen Ereignisse zu messen. Das gilt einmal für den Einzelbruch, der sowohl durch direkte Energieabsorption erzeugt wird als auch durch diffusible Radikale aus dem Wasser. Die gesamte, im Wasser des Nukleoproteingels absorbierte Energie trägt also zur Entstehung der Brüche bei, möglicherweise auch die im Proteinhülle absorbierte Energie. Das gleiche gilt auch für die Doppelbrüche. Hier ist der G-Wert bei 80 % H₂O etwa gleich dem bei Bestrahlung unter N₂. Offenbar sind im Nukleoproteingel die Doppelstränge der DNS so angeordnet, daß die in der Umgebung absorbierten Primärionisationen mit mehr als einer Einzelionisation zu Doppelbrüchen führen. Die von LUZZATI und NIKOLAIEFF (1963) diskutierte, bündelartige Anordnung der DNS-Stränge im Nukleoproteingel könnte dies ermöglichen.

4. Sauerstoffeffekt am Nukleoprotein

Eine der wesentlichsten Fragen dieser Untersuchung war, wie sich die Strahlenempfindlichkeit der DNS im Nukleoprotein unter Einfluß des Sauerstoffs verändert. Um möglichst vergleichbare Versuchsbedingungen zu haben, setzen wir die Versuchsserie in O_2 mit der in N_2 in Beziehung und berechnen das Verhältnis der Strahlenempfindlichkeit in O_2 zu N_2 aus den jeweiligen G-Werten für die einzelnen Ereignisse. Es wird häufig als OER (oxygen enhancement ratio) bezeichnet. Aus Tabelle 9 ergeben sich die folgenden Werte dafür, die mit einigen Daten aus der Literatur verglichen werden:

Präparation	Strahlenschaden	OER	Autor
trock. Nukleoprotein	Doppelbruch (B)	5,05	diese Arbeit
" "	Einzelbruch (p)	3,30	" "
" "	Vernetzung (Q)	2,51	" "
trockene DNS	Doppelbruch (B)	1,45	Hagen u. Wellstein (1965)
" "	Einzelbruch (p)	5,40	" "
" "	Vernetzung (Q)	0,43	" "
DNS in Thymocyten	Einzelbruch (p)	2,15	Lett u.a. (1967)
DNS in Bakteriensporen Transformation		2,33	Tanooka u. Hutchinson (1965)
DNS in Bakterien	Transformation	3,0	Hutchinson u. Arena (1960)
DNS in Bakterienextrakt	Transformation	3,0	Hutchinson (1961)
DNS in Lösung	"	1,0	" "
DNS in Lösung u. 0,0014 M Gluthation	"	3,0	" "

An der DNS im Nukleoprotein fanden wir einen ausgeprägten Sauerstoffeffekt, sowohl bei den Einzelbrüchen als auch bei den Doppelbrüchen und sogar bei den Vernetzungen. Im Gegensatz dazu wurde an reiner DNS nur bei den Einzelbrüchen

ein ausgeprägter O_2 -Effekt gefunden, dies wurde bei den Doppelbrüchen kaum beobachtet; die Vernetzungen nahmen sogar ab. Der Sauerstoffeffekt tritt dabei nur auf, wenn die biologische Substanz (Enzyme, transformierende DNS oder Bakteriophagen) im Trockenen bestrahlt werden, nicht aber, wenn sie dabei in feuchtem Zustand sind (ALPER, 1968).

Untersucht man die Strahlenempfindlichkeit der DNS in Zellen, findet man wieder einen Sauerstoffeffekt. Auch die Inaktivierung der Vermehrungsfähigkeit von Bakterien, die möglicherweise zum größten Teil auf die Strahlenschädigung der DNS zurückzuführen ist, zeigt eine OER von 2,7 - 3,1 (vergl. DERTINGER u. JUNG, 1969).

Diese Beobachtungen machen nicht unwahrscheinlich, daß sowohl im Nukleoprotein als auch in der lebenden Zelle die strahlensensibilisierende Wirkung an der DNS erst unter Beteiligung des Proteins zustande kommt, ähnlich wie die Zugabe von Gluthation zur DNS-Lösung erst einen Sauerstoffeffekt auslöst (HUTCHINSON, 1961). Über die chemischen Reaktionen, die dabei beteiligt sind, können jedoch noch keine sicheren Aussagen gemacht werden.

In diesem Zusammenhang müssen die Überlegungen erwähnt werden, die in der Zelle zur Strahlensensibilisierung unter Sauerstoff führen könnten (vergl. auch DERTINGER u. JUNG, 1969). Sie gehen zurück auf eine Arbeit von HOWARD-FLANDERS (1958), die von der Annahme ausgeht, daß der Sauerstoff Restitutionsvorgänge an den biologischen Makromolekülen verhindert. Während sich ohne ihn die durch Strahlung erzeugten Radikale wieder vereinigen können, entstehen mit diesem Peroxyradikale, die eine Restitution nicht zulassen. Diese, in der Einleitung schon erwähnte Vorstellung läßt sich auf die Strahlenempfindlichkeit von Mikroorganismen erweitern. Hier kann man annehmen, daß es zwei verschiedene Typen von Schäden gibt, die zur Inaktivierung führen. Typ 1 ist ein Schaden, der erst durch die Reaktion mit O_2

in einen letalen Schaden überführt wird, während Typ 2 stets letal ist und dessen Bild nicht durch Sauerstoff beeinflusst wird. Mit dieser Annahme kann man auch den Verlauf der Strahlenempfindlichkeit bei verschiedenem Sauerstoffpartialdruck befriedigend beschreiben (ALPER, 1956).

Es besteht nun die Aufgabe, die angenommenen Typen des Strahlenschadens auch zu konkretisieren, d.h. wir müssen einmal Strahlenreaktionen in den Bakterien finden, die durch Sauerstoff erheblich gesteigert werden und andere, die durch O_2 nicht beeinflusst werden. Beide Reaktionen müssen zusätzlich noch letal wirksam sein.

Nach den Untersuchungen von HAGEN und WELLSTEIN (1965) hat es den Anschein, daß Einzelbrüche der DNS mit ihrer hohen OER dem Typ 1 zugeordnet seien, Doppelbrüche mit kleiner OER dem Typ 2. Nach den vorliegenden Versuchen über die Strahlenempfindlichkeit der DNS im Nukleoprotein muß diese Annahme fallengelassen werden. Vielmehr hat es den Anschein, daß alle Strahlenreaktionen an der DNS einen Sauerstoffeffekt zeigen und somit dem Schadenstyp 1 zugeordnet werden müssen. Es besteht nun die Aufgabe, andere letal wirkende Strahlenreaktionen zu finden, die keinen O_2 -Effekt zeigen und als Typ 2 beschrieben werden können. Dabei können einmal die Reaktionen beteiligt sein, die auch unter N_2 an der DNS ablaufen, oder auch ganz andere Reaktionen, die nicht mit der DNS zu tun haben.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird Desoxyribonucleoprotein trocken und als Gel (65 % Feuchtigkeit) mit ^{60}Co - γ -Strahlen bestrahlt. Das trockene Nukleoprotein wurde im Vakuum, in Sauerstoff und Stickstoff behandelt. Die DNS wird vom Protein getrennt und anschließend auf Brüche im Einzel- und Doppelstrang, sowie auf Vernetzungen analysiert.

Dazu dienten hydrodynamische Methoden, wie Viskositäts- und Sedimentationsbestimmungen.

Einzel- und Doppelbrüche, sowie Vernetzungen der trockenen Proben, die auf ein einzelnes Absorptionsereignis zurückzuführen sind, steigen linear mit der Dosis an. Das Verhältnis der Strahlenempfindlichkeit in O_2 zu N_2 (OER) wird aus den jeweiligen G-Werten berechnet. Für den Doppelbruch ergab sich ein OER von 5,05, für den Einzelbruch von 3,30 und für Vernetzungen von 2,51.

Bei der Bestrahlung des feuchten Nukleoproteingels ergaben sich gekrümmte Kurven. Aus der Anfangsneigung konnten wir die G-Werte ermitteln, woraus sich ein Verhältnis von Einzel- zu Doppelbrüchen wie 10:1 errechnet.

Bei der Analyse der Sedimentationsverteilung zeigten sich Molekülfraktionen, die größer sind als unbestrahlte Moleküle, d.h. es wurden intermolekulare Vernetzungen beobachtet. Vergleicht man das Verhältnis der G-Werte von Vernetzungen und Brüchen am Doppelstrang, so ergeben sich folgende Werte für G_Q/G_B : Vakuum = 0,508; N_2 = 0,468; O_2 = 0,232. Auffallend ist das deutliche Absinken der Vernetzungen unter Sauerstoff.

VI. Literatur

ALEXANDER, P., J.T. LETT, P. KOPP, and R. ITZHAKI (1961)
Degradation of Dry Deoxyribonucleic Acid by Polonium
Alpha-Particles.

Rad. Res. 14, 363

ALPER, T. (1956)

The Modification of Damage Caused by Primary Ionization
of Biological Targets.

Rad. Res. 5, 573

ALPER, T. (1968)

Radiation - induced Lethality and DNA Strand breakage:
the Relevance of the Oxygen Effect.

Int. J. Radiat. Biol. 14, 83

BOHNE, L. (1968)

Brüche und Vernetzungen in bestrahlter Desoxyribonuclein-
säure von Bakteriophagen.

Dissertation, Karlsruhe

BOHNE, L., Th. COQUERELLE und U. HAGEN (1969)

Strahlenempfindlichkeit von Bakteriophagen-DNS.

II. Brüche und Vernetzungen nach Bestrahlung in vivo.

Manuskript in Vorbereitung

BRUSTAD, T. (1966)

The Effects of Radical Scavengers on the Radiosensitivity
of Lysozyme in Dilute Aqueous Solutions of Varying pH.

Rad. Res. 27, 456

CANTOW, H.J. (1959)

Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung durch Sedimen-
tation in der Ultrazentrifuge bei Flory-Temperaturen.

Makromolekulare Chemie 30, 169

CHARLESBY, A. (1960)

Atomic Radiation and Polymers.

Pergamon Press, Oxford

COLTER, J.S., R.A. BROWN, and K.A.O. ELLEM (1962)

Observations on the Use of Phenol for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid.

Biochim. Biophys. Acta 55, 31

COQUERELLE, Th., L. BOHNE, U. HAGEN und J. MERKWITZ (1969)

Strahlenempfindlichkeit von Bakteriophagen-DNS.

I. Brüche und Vernetzungen nach Bestrahlung in vitro.

Z. f. Naturforschg., im Druck

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

Interruptions in the Polynucleotide Strands in Bacteriophage DNA.

J. Mol. Biol. 8, 1 - 10

DETINGER, H. und H. JUNG (1969)

Molekulare Strahlenbiologie.

Springer Verlag, Heidelberg

DOTY, P., B.B. MCGILL, and S.A. RICE (1958)

The Properties of Sonic Fragments of Deoxyribose Nucleic Acid.

Proc. Nat. Acad. of Science 44, 432

DOUNCE, A.L., B.B. LOVE, J. DE SIMONE, and M.S. MACKAY (1966)

The Visco-Elastic Properties of DNA-Nucleoprotein Gels.

Proc. Internat. Symp. on The Cell Nucleus-Metabolism and Radiosensitivity, Taylor & Francis LTD, pp. 147

EIGNER, J., C. SCHILDKRAUT, and P. DOTY (1962)

Concentration Effects in the Hydrodynamic Properties of DNA.

Biochim. Biophys. Acta 55, 13

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

The Native Denatured and Renatured States of Deoxyribonucleic Acid.

J. Mol. Biol. 12, 549

HAGEN, U. und H. WELLSTEIN (1965)

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

HAGEN, U. (1967)

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

Biochim. Biophys. Acta 134, 45

HENGLEIN, A. and W. SCHNABEL (1966)

Radiation Chemistry of Synthetic Macromolecules in Solution, LET Effects.

In: "Current Topics in Radiation Research" (ed. M. Ebert and A. Howard), North-Holland Publish. Comp., Amsterdam, Vol. II

HOWARD-FLANDERS, P. (1958)

Physical and Chemical Mechanisms in the Injury of Cells by Ionizing Radiations.

In: Advances in Biological and Medical Physics, Vol. VI. Eds. C.A. Tobias and J.H. Lawrence.

Academic Press, New York, 1958, p. 533

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

Destruction of the Activity of Deoxyribonucleic Acid in Irradiated Cells.

Rad. Res. 13, 137

HUTCHINSON, F. (1961)

Sulphydryl Groups and the Oxygen Effect on Irradiated Dilute Solutions of Enzymes and Nucleic Acids.

Rad. Res. 14, 721-731

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

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

Rad. Res. 15, 159

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

Crosslinking of Dry Deoxyribonucleic Acids by Electrons.

Rad. Res. 14, 349

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

Rejoining of X-ray Induced Breaks in the DNA of Leukaemia Cells.

Nature 214, 790

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

Degradation by Gamma-Irradiation of Thymus Deoxyribonucleohistone in Solution.

Nature 200, 428

LLOYD, P.H., and A.R. PEACOCKE (1968)

The Dissociation of Histone from Deoxyribonucleohistone by γ -Irradiation.

Biochem. J. 109, 341

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

RANDALL (1951)

Protein Measurements with the Folin-Phenol Reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265

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

The Structure of Nucleohistones and Nucleoprotamines.

J. Mol. Biol. 7, 142

- MANDELKERN, L., W.R. KRIGBAUM, H.A. SCHERAGA, and P.J. FLORY (1952)
Sedimentation Behavior of Flexible Chain Molecules : Polyisobutylene.
J. Chem. Phys. 20, 1392
- OKSMO, O., and T. BRUSTAD (1968)
On the X-ray Inactivation at Various Temperatures of Trypsin in Dry State and Aqueous Solution.
Z. f. Naturforschg. 23b, 962
- PEACOCKE, A.R., and B.N. PRESTON (1961)
Effect of Gamma-Rays on Thymus Nucleoprotein in Solution.
Nature 192, 228
- SCHUMAKER, V.N., and H.K. SCHACHMAN (1957)
Ultracentrifugal Analysis of Dilute Solutions.
Biochim. Biophys. Acta 23, 628
- TANOOKA, H., and F. HUTCHINSON (1965)
Modifications of the Inactivation by Ionizing Radiations of the Transforming Activity of DNA in Spores and Dry Cells.
Rad. Res. 24, 43
- THOMAS, R. (1954)
Recherches sur la Dénaturation des Acides Désoxyribonucléiques.
Biochim. Biophys. Acta 14, 231
- WEINERT, H. (1967)
Über die Strahlenempfindlichkeit der Desoxyribonucleinsäure im Nukleoprotein.
Dissertation, Freiburg
- WEINERT, H. und U. HAGEN (1968)
Über die Strahlenempfindlichkeit der Desoxyribonucleinsäure im Chromatin.
Strahlentherapie 136, 204

WEISS, J.J. (1964)

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

Progress in Nucleic Acid Res. 3, 103

ZAMENHOF, S. (1957)

Preparation and Assay of deoxyribonucleic Acid from
Animal Tissue.

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

VII. Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Molekulargewichte nativer DNS nach Bestrahlung von Nukleoprotein-Gel,
65 % Feuchtigkeit (Versuchsserie A).

Dosis (M-rad)	s°	$[\eta]$	$M_{s\eta} \cdot 10^{-6}$	$M_w \cdot 10^{-6}$	$M_n \cdot 10^{-6}$	$A \cdot 10^4$	$\Omega \cdot 10^4$
Kontrolle	18,70	4400	6,67	5,43	3,10		
	19,23	4950	7,36	6,07	3,23		
	18,38	4600	6,64	5,69	2,56		
	19,34	3750	6,46	7,76	3,05		
1	16,18	2520	4,05	4,29	2,05	0,92	0,004
	16,55	2425	4,12	4,48	1,73	1,67	0,426
2	13,85	1500	2,48	2,56	1,16	3,31	0,226
	12,88	1025	2,10	2,21	1,10	3,46	-0,082
3	10,20	450	0,85	1,22	0,31	20,84	6,358
	10,53	350	0,79	1,45	0,47	12,69	3,073
4	8,17	1110	0,32	0,79	0,20	36,65	11,466
	8,29	99	0,29	0,82	0,16	46,46	16,612

Tabelle 2: Molekulargewichte nativer DNS nach Bestrahlung von trockenem Nukleoprotein im Vakuum.
(Versuchsserie B).

Dosis (M-rad)	S°	$[\eta]$	$M_{s\eta} \cdot 10^{-6}$	$M_w \cdot 10^{-6}$	$M_n \cdot 10^{-6}$	$A \cdot 10^4$	$\Omega \cdot 10^4$
Kontrolle	18,68	5075	7,13	5,35	2,98		
	18,11	5500	7,10	5,19	2,92		
	19,95	4800	7,66	7,77	3,36		
	19,79	5250	7,91	7,36	3,34		
2	17,10	2575	4,45	5,78	2,39	0,78	0,29
	17,62	2550	4,63	6,10	2,78	0,32	0,11
4	18,79	2410	4,97	8,02	2,20	0,78	0,86
	16,26	2350	3,78	6,82	2,07	1,44	0,78
6	15,43	2300	3,61	6,91	1,80	2,00	1,05
	16,32	2250	3,88	6,47	1,88	1,81	0,91
8	14,93	1680	2,94	5,97	1,40	3,21	1,53
	15,76	1575	3,08	6,30	1,68	2,27	1,12

Tabelle 3: Molekulargewichte nativer DNS nach Bestrahlung von trockenem Nukleoprotein in Sauerstoff-
Atmosphäre (Versuchsserie C).

Dosis (M-rad)	S°	$[\eta]$	$M_{s\eta} \cdot 10^{-6}$	$M_w \cdot 10^{-6}$	$M_n \cdot 10^{-6}$	$A \cdot 10^4$	$\Omega \cdot 10^4$
Kontrolle	20,70	5950	9,00	7,92	3,91		
	20,40	5550	8,51	7,49	3,50		
	20,47	6400	9,19	8,11	3,77		
	21,58	5875	9,52	9,54	3,84		
1	15,87	2775	4,13	4,05	1,12	4,77	1,60
	16,03	2900	4,29	4,80	2,01	1,57	0,25
2	13,42	2280	2,91	2,13	0,90	5,83	0,61
	13,25	2310	2,88	2,37	0,93	5,46	0,86
3	14,27	2450	3,32	3,51	1,04	5,14	1,56
	13,56	1980	2,76	2,99	0,91	6,10	1,73
4	12,14	1760	2,20	2,03	0,68	8,33	1,87
	11,74	1770	2,20	2,00	0,75	7,24	1,27
6	10,52	1160	1,44	1,51	0,44	14,18	3,72
	9,91	1120	1,30	1,30	0,29	-	-
8	9,55	1085	1,20	1,11	0,34	19,01	4,66
	9,71	1120	1,26	1,23	0,42	14,79	3,11

Tabelle 4: Molekulargewichte nativer DNS nach Bestrahlung von trockenem Nukleoprotein in Stickstoff-
Atmosphäre (Versuchsserie D).

Dosis (M-rad)	S°	$[\eta]$	$M_{s\eta} \cdot 10^{-6}$	$M_w \cdot 10^{-6}$	$M_n \cdot 10^{-6}$	$A \cdot 10^4$	$\Omega \cdot 10^4$
Kontrolle	21,73	5650	9,46	10,67	3,90		
	21,62	5850	9,55	10,29	3,59		
	21,08	5000	8,48	10,61	3,91		
	21,82	4900	8,86	11,40	3,85		
4	17,20	3210	5,02	9,36	1,81	2,32	1,08
	16,84	3300	4,92	7,67	1,76	2,38	0,96
8	17,00	3150	4,87	15,25	1,90	2,31	1,32
	16,78	3100	4,75	14,45	1,77	2,60	1,45
12	14,48	2100	3,13	7,59	0,98	6,31	2,90
	15,53	2200	3,56	11,47	1,01	6,04	3,05
16	13,58	1165	2,12	5,45	0,74	8,66	3,73
	13,42	1360	2,25	6,08	0,91	6,60	2,85

Tabelle 5: Molekulargewichte denaturierter DNS nach Bestrahlung von Nukleoprotein-Gel, 65 % Feuchtigkeit (Versuchsserie A).

Dosis (M-rad)	S°	M _w · 10 ⁻⁶	M _n · 10 ⁻⁶	α · 10 ⁴	ω · 10 ⁴
Kontrolle	11,72	1,85	0,827		
	11,87	2,04	0,746		
	12,05	1,93	0,869		
	11,87	2,08	0,781		
1	8,00	0,65	0,148	20,49	7,09
	7,53	0,57	0,189	13,99	3,14
2	6,62	0,44	0,103	31,30	10,12
	6,70	0,44	0,080	42,47	15,66
3	5,04	0,28	0,047	79,85	30,23
	5,01	0,34	0,051	106,17	28,42
4	4,48	0,22	0,035	112,38	43,67
	4,50	0,28	0,033	112,65	46,22

Tabelle 6: Molekulargewichte denaturierter DNS nach Bestrahlung von trockenem Nukleoprotein im Vakuum (Versuchsserie B).

Dosis (M-rad)	S ^o	M _w · 10 ⁻⁶	M _n · 10 ⁻⁶	α · 10 ⁴	ω · 10 ⁴
Kontrolle	11,55	1,89	0,89		
	11,16	1,55	0,81		
	12,34	1,96	0,76		
	12,22	1,97	0,82		
2	8,32	0,78	0,26	9,50	2,43
	8,44	0,81	0,31	7,15	1,43
4	7,27	0,51	0,17	15,98	3,48
	7,01	0,52	0,15	19,24	5,27
6	6,98	0,56	0,14	22,87	7,57
	7,81	0,66	0,19	15,13	4,53
8	7,20	0,51	0,12	27,36	9,34
	7,42	0,60	0,17	16,90	4,98

Tabelle 7: Molekulargewichte denaturierter DNS nach Bestrahlung von trockenem Nukleoprotein in Sauerstoff-Atmosphäre (Versuchsserie C).

Dosis (M-rad)	S°	M _w · 10 ⁻⁶	M _n · 10 ⁻⁶	α · 10 ⁴	ω · 10 ⁴
Kontrolle	12,24	2,01	0,934		
	12,32	2,32	1,062		
	11,53	1,71	0,642		
	11,48	1,78	0,648		
1	8,38	0,81	0,214	24,42	4,29
	8,32	0,72	0,218	12,60	3,57
2	6,28	0,36	0,087	37,76	11,76
	7,03	0,55	0,103	32,32	11,91
3	6,50	0,42	0,081	43,96	16,09
	6,71	0,50	0,097	34,53	12,65
4	5,63	0,30	0,062	90,73	18,99
	5,73	0,30	0,056	63,87	23,12
6	4,77	0,22	0,031	121,28	36,82
	5,18	0,24	0,040	89,80	33,42
8	4,80	0,21	0,037	98,05	35,51
	4,61	0,19	0,029	125,95	48,34

Tabelle 8: Molekulargewichte denaturierter DNS nach Bestrahlung von trockenem Nukleoprotein in Stickstoff-Atmosphäre (Versuchsserie D).

Dosis (M-rad)	S°	M _w · 10 ⁻⁶	M _n · 10 ⁻⁶	α · 10 ⁴	ω · 10 ⁴
Kontrolle	12,23	2,00	0,648		
	12,60	2,18	0,909		
	12,54	2,07	0,629		
	12,34	2,22	0,601		
4	7,96	0,73	0,191	19,07	4,67
	7,20	0,53	0,118	34,15	10,51
8	6,68	0,49	0,093	39,23	12,65
	7,08	0,55	0,105	36,84	12,18
12	6,40	0,43	0,089	40,82	12,60
	6,19	0,40	0,067	56,92	20,08
16	5,82	0,35	0,073	49,60	15,26
	5,42	0,30	0,038	102,64	40,26

Tabelle 9: G-Werte für Brüche und Vernetzungen
der DNS

Bestrahlungs- bedingungen	nat. denat.	B · 10 ¹⁰	G-Wert
Vakuum	nat.	0,310 ± 0,027	0,0185
N ₂	"	0,471 ± 0,031	0,0288
O ₂	"	2,381 ± 0,206	0,1454
Gel	"	1,50*	0,0377
		p · 10 ¹⁰	
Vakuum	denat.	3,624 ± 0,267	0,444
N ₂	"	5,058 ± 0,541	0,619
O ₂	"	16,670 ± 1,368	2,040
Gel	"	17,00*	0,415
		Q · 10 ¹⁰	
Vakuum	nat.	0,158 ± 0,016	0,0097
N ₂	"	0,220 ± 0,011	0,0135
O ₂	"	0,551 ± 0,085	0,0337
Gel	"	0,50*	0,0125
		q · 10 ¹⁰	
Vakuum	denat.	0,989 ± 0,109	0,1210
N ₂	"	1,636 ± 0,217	0,2002
O ₂	"	5,121 ± 0,249	0,6250
Gel	"	400*	0,0968

* graphisch aus der Anfangssteigung der Dosiseffektkurve
ermittelt

Abb. 1: Vorrichtung zum Einfüllen von Sauerstoff (Stickstoff) in die mit trockenem Nukleoprotein gefüllten, evakuierten Ampullen.

a, b : Ölbehälter

c, d : Hahn

e : Ampullen mit Nukleoproteinproben

f : Vakuumpumpe

g : Pumpstand

h : Gasstrom

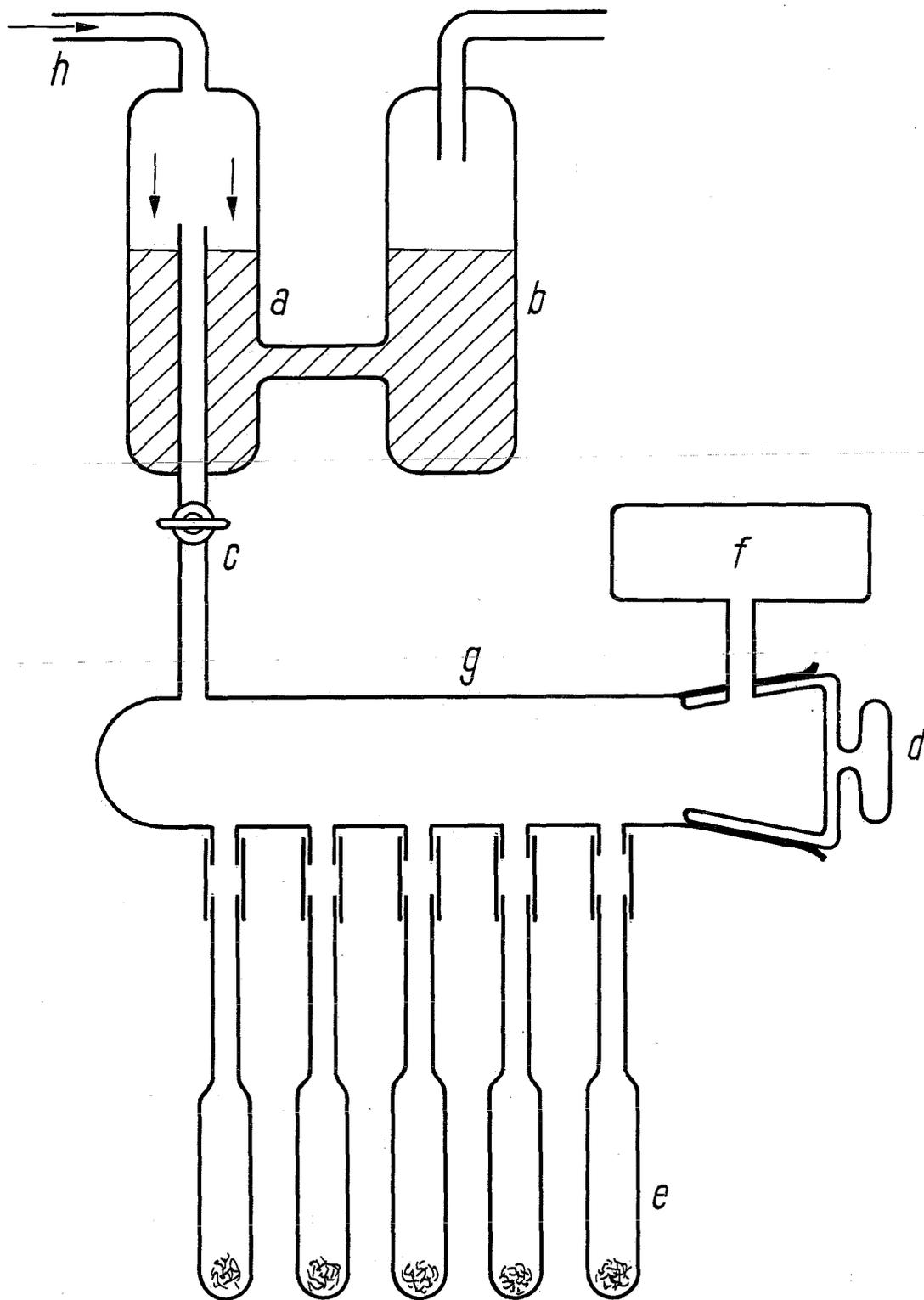


Abb. 2: Konzentrationsverlauf in der Zelle der analytischen Ultrazentrifuge und seine Auswertung in der Absorptionsoptik. Sedimentation der Moleküle nach rechts in Richtung des Pfeils.

- a) Einzelsektorzelle mit Teilchen, die zur Hälfte sedimentiert sind
- b) Konzentration als Funktion des Abstandes r von der Rotorachse
- c) Abbildung auf dem Film
- d) Abbildung mit dem Scanning-System. Zentrifugation in der Doppelsektorzelle. Rechts von dem Konzentrationsverlauf die Eichstufen mit je 0,2 OD. Darunter die 1. Ableitung mit dem Scanning-System

Verwendet wurde T1-DNS, 40 $\mu\text{g/ml}$ in 0.165 M NaCl, Sedimentation bei 15 000 rev/min, Aufnahme nach 200 min. Die Filmaufnahme mit einer Einzelsektorzelle entspricht nicht genau der Aufnahme mit dem Scanningsystem mit der Doppelsektorzelle.

M_1 : Meniskus im Sektor mit dem Lösungsmittel

M_2 : Meniskus im Sektor mit der Lösung

RLM: Referenzlinie am Meniskus

RLB: Referenzlinie am Zellboden

Figur 2

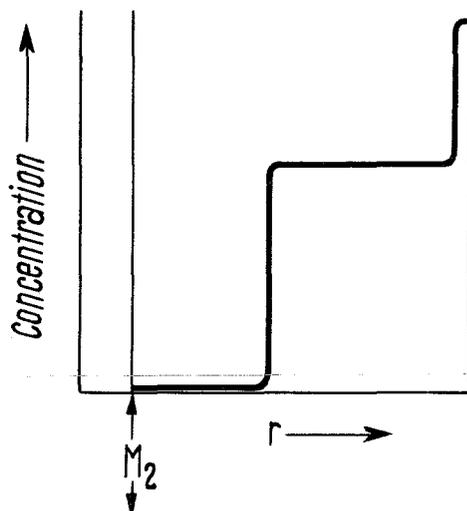
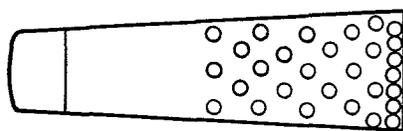


Abb. 3: Beziehung zwischen S^0 und $[\eta]$ bei nativer Kalbs-
thymus-DNS isoliert aus bestrahltem Nukleoprotein.

- ▲ Nukleoproteingel (65 % Feuchtigkeit)
- trockenes Nukleoprotein im Vakuum
- N " " in Stickstoff
- o " " in Sauerstoff

Die ausgezogene Kurve entspricht Werten für
native DNS nach EIGNER und DOTY (1965).

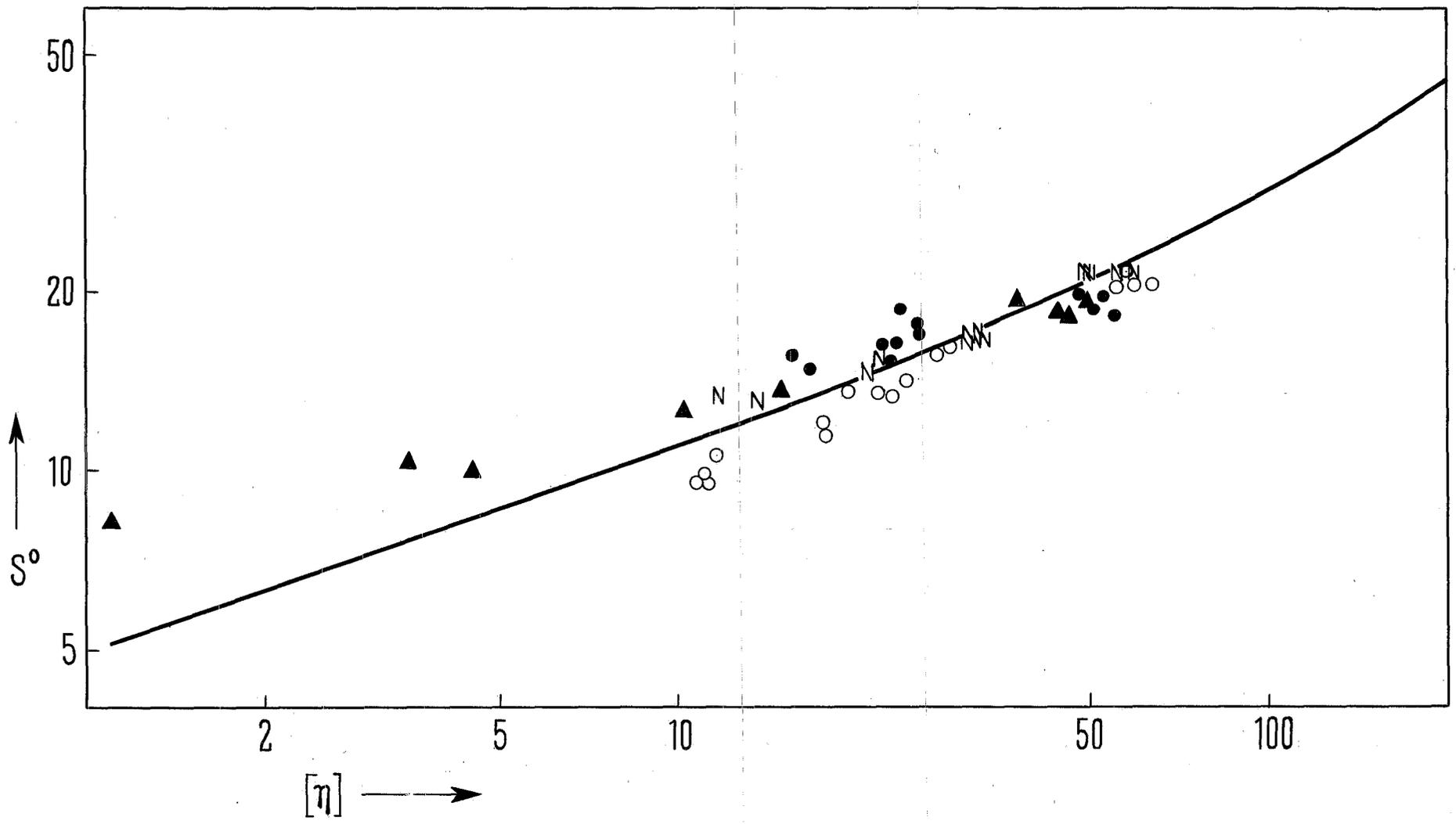
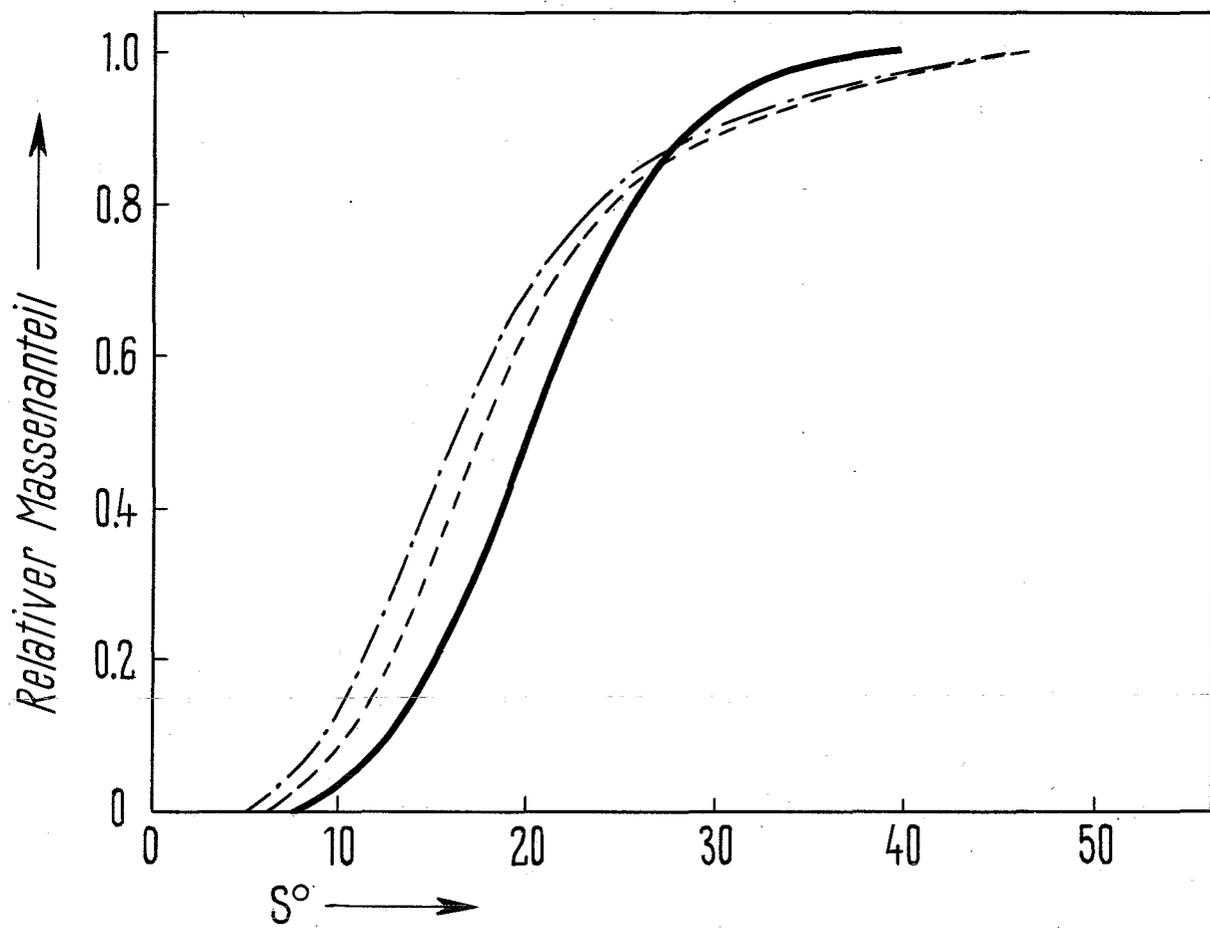
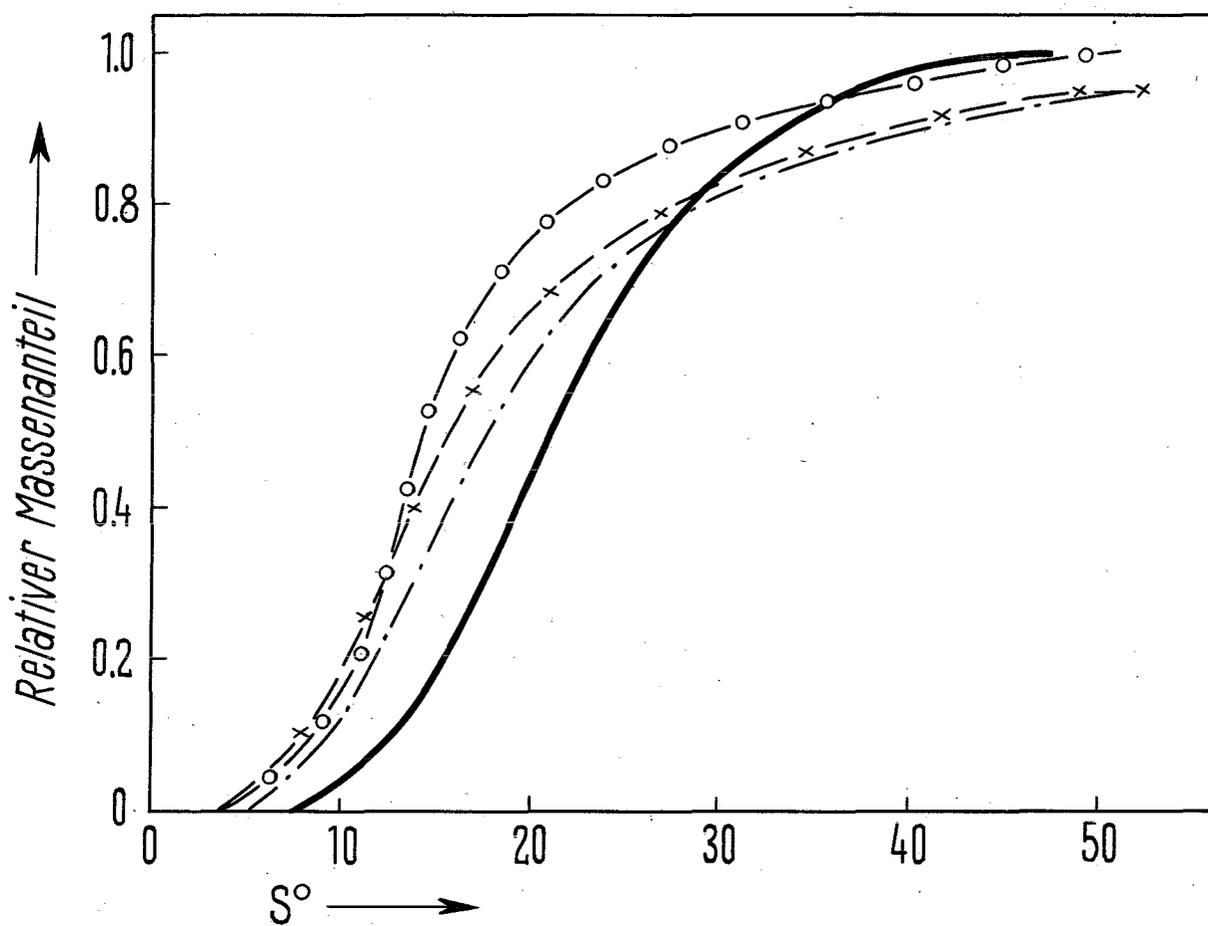


Abb. 4: Sedimentationsverteilung von nativer DNS nach
Bestrahlung
a : des trockenen Nukleoproteins im Vakuum
b : des trockenen Nukleoproteins in Stickstoff

—————	Kontrolle
- - - - -	4 Mrad
— . — . — . —	8 Mrad
— x — — x —	12 Mrad
— o — — o —	16 Mrad



a



b

Abb. 5: Sedimentationsverteilung von nativer DNS nach Bestrahlung
a : des trockenen Nukleoproteins in Sauerstoff
b : des Nukleoproteingels (65 % Feuchtigkeit)

—————	Kontrolle
—————	1 Mrad
.....	2 Mrad
- - - - -	4 Mrad
- . - . - . -	8 Mrad

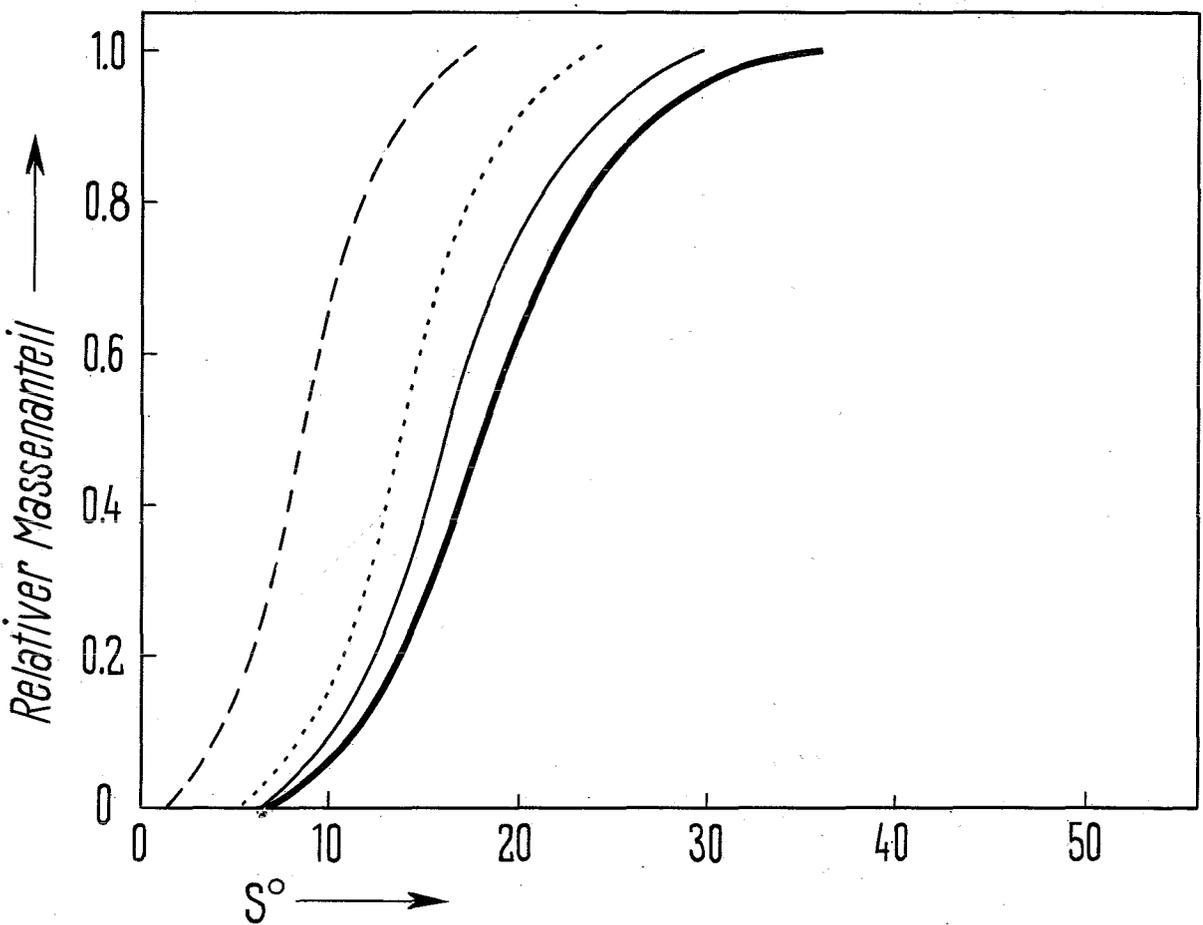
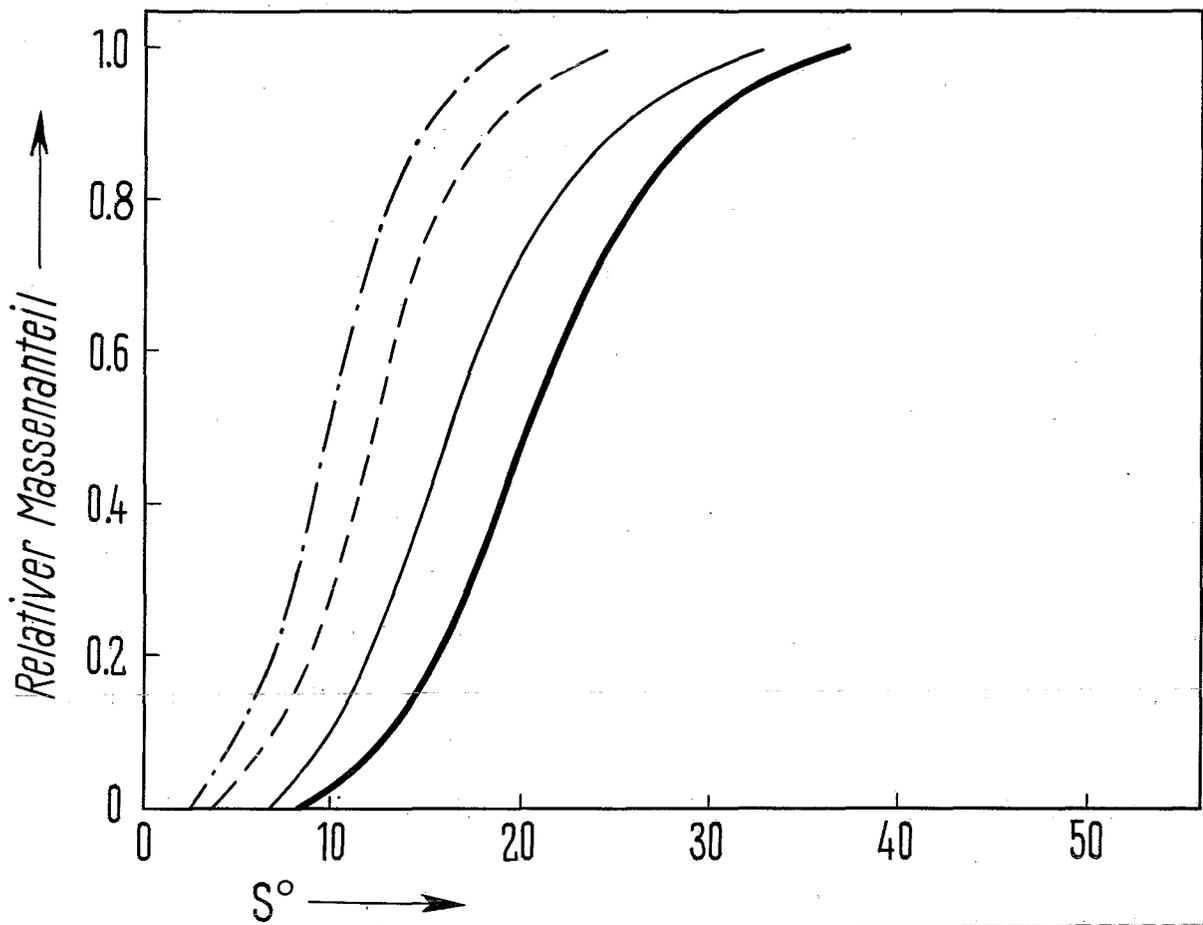


Abb. 6: Sedimentationsverteilung von denaturierter DNS
nach Bestrahlung

a : des trockenen Nukleoproteins in Sauerstoff

b : des trockenen Nukleoproteins in Stickstoff

—————	Kontrolle
—————	1 Mrad
- - - - -	4 Mrad
- . - . - .	8 Mrad
- o - - - o -	16 Mrad

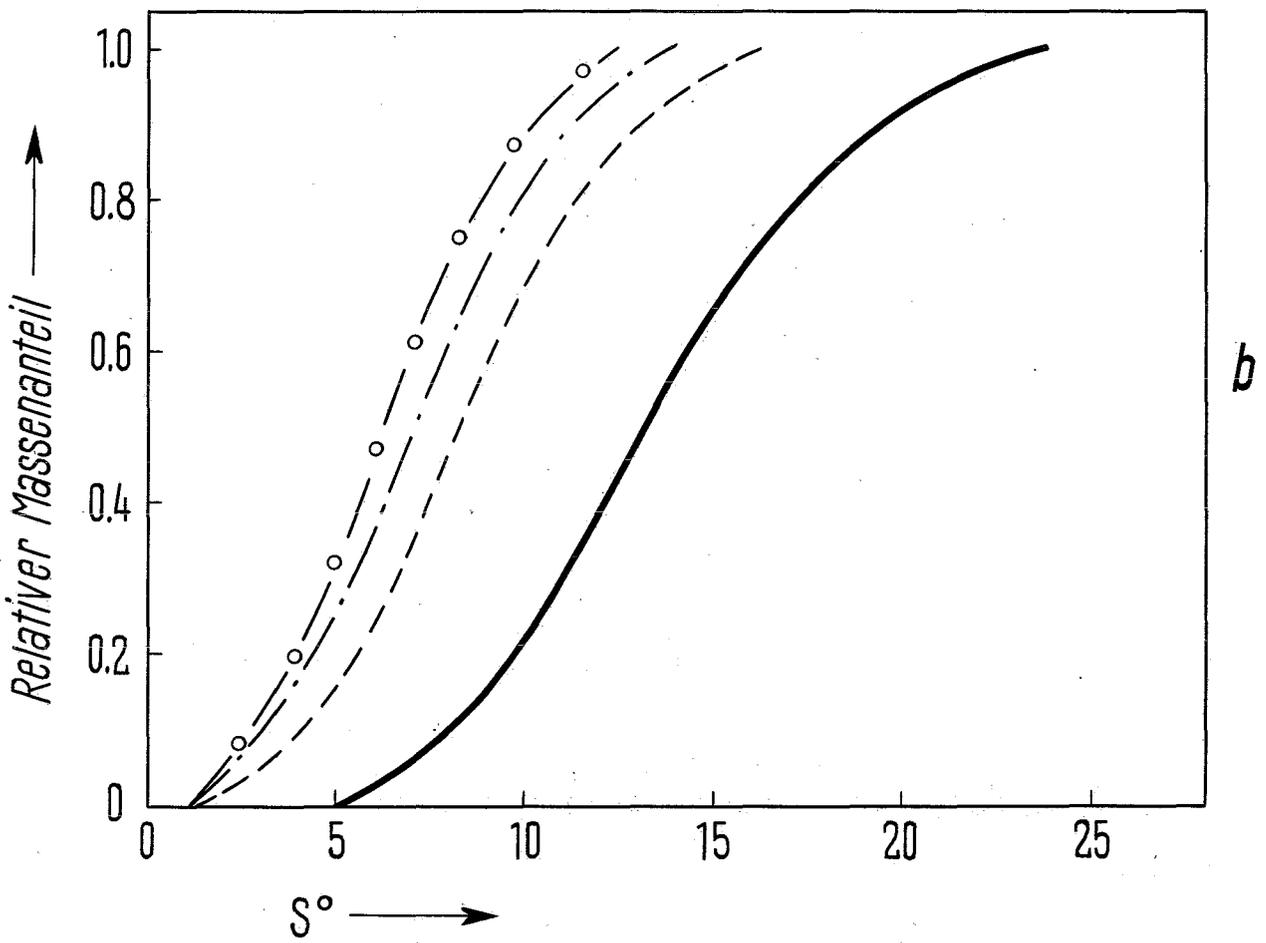
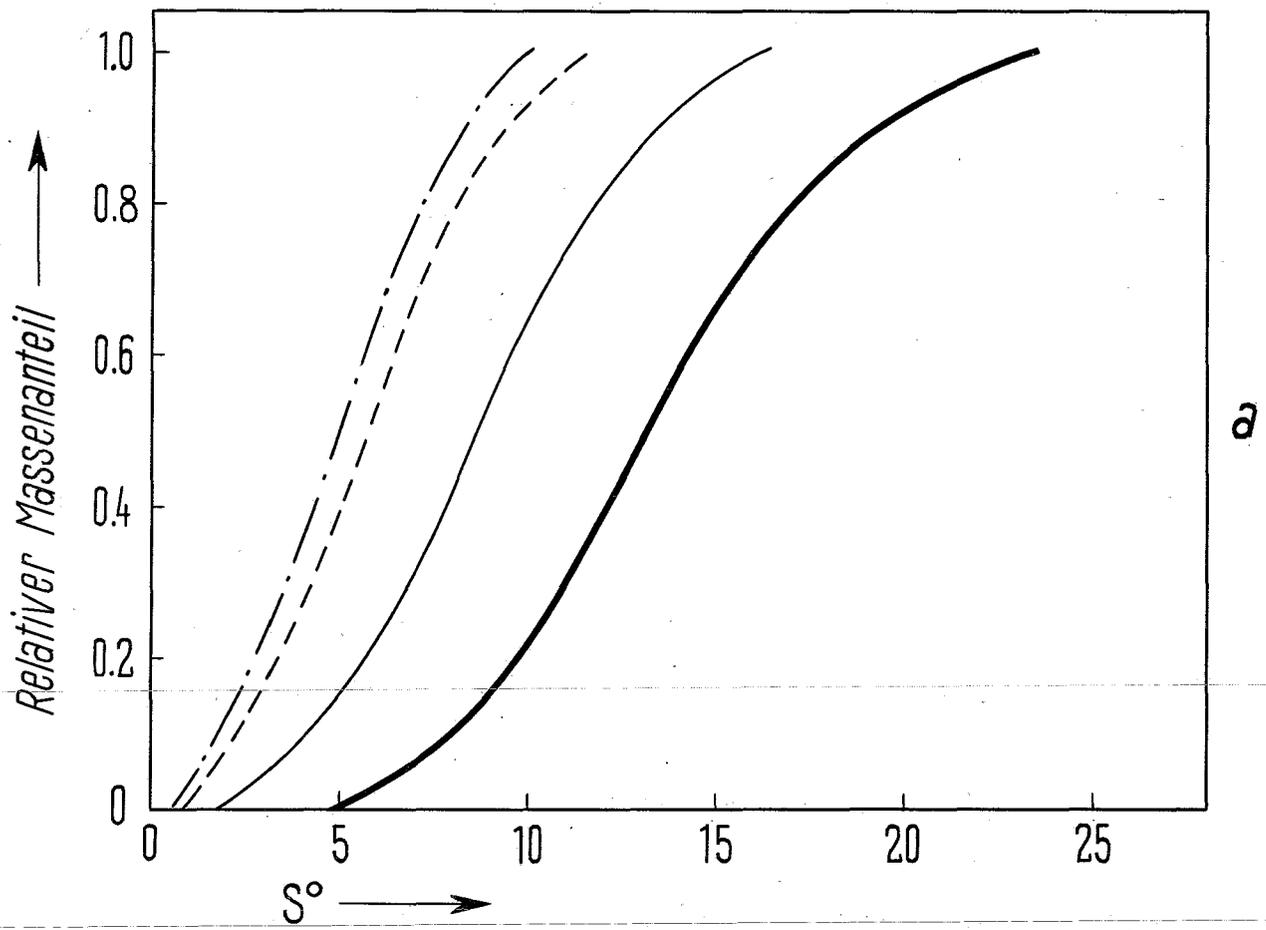


Abb. 7: Beziehung zwischen Bruchwahrscheinlichkeit und Strahlendosis von DNS in Nukleoproteingel (65 % Feuchtigkeit). Messpunkte jeweils Mittelwerte aus vier Einzelwerten.

- Bruchwahrscheinlichkeit A (Doppelbruch)
- Bruchwahrscheinlichkeit α (Einzelbruch)

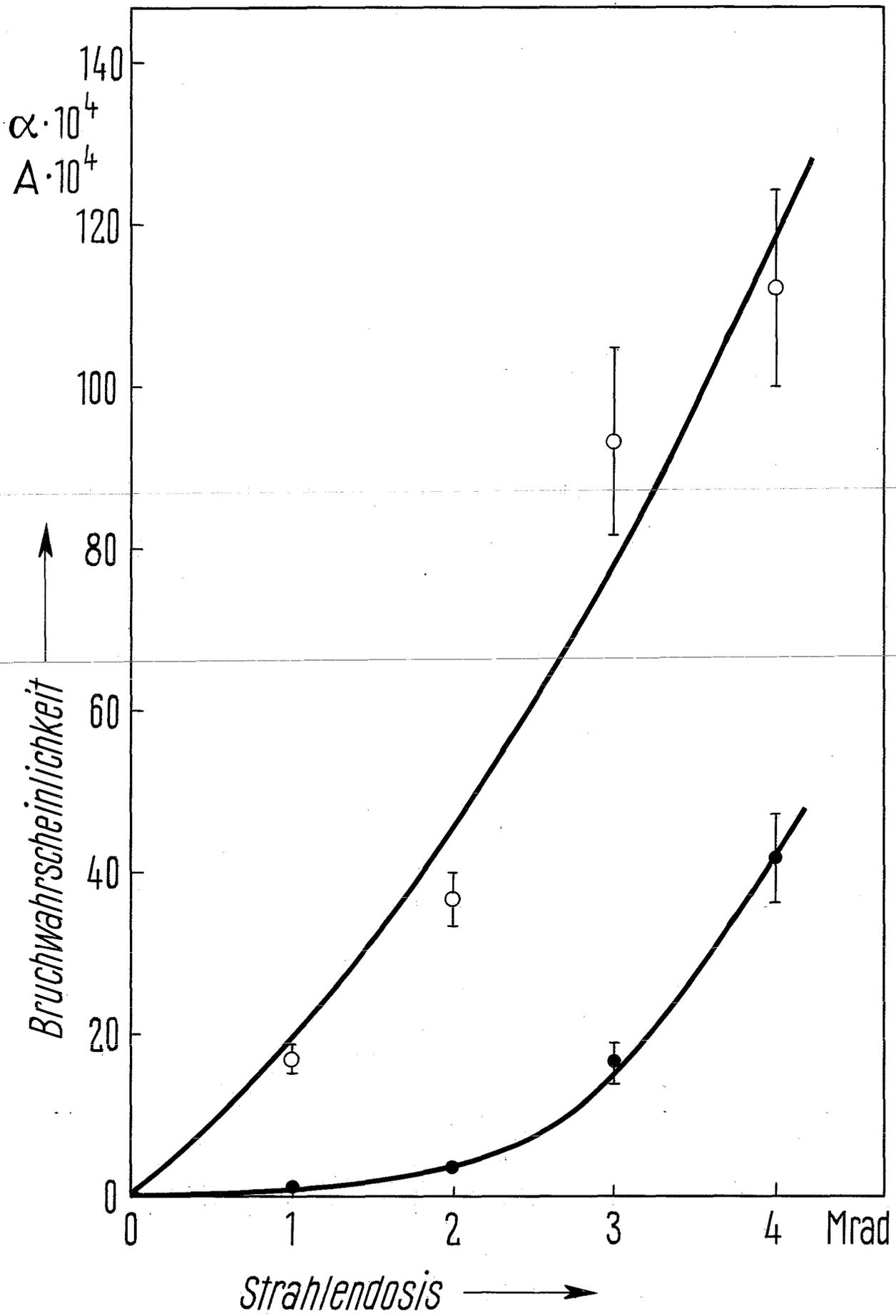


Abb. 8: Beziehung zwischen Bruchwahrscheinlichkeit A (Doppelbruch) und Strahlendosis von DNS im trockenen Nukleoprotein unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen. Die ausgezogenen Linien ergeben sich aus der mittleren Bruchwahrscheinlichkeit pro Dosis. Messpunkte jeweils Mittelwerte aus vier Einzelmessungen.

- Vakuum
- N Stickstoff
- o Sauerstoff

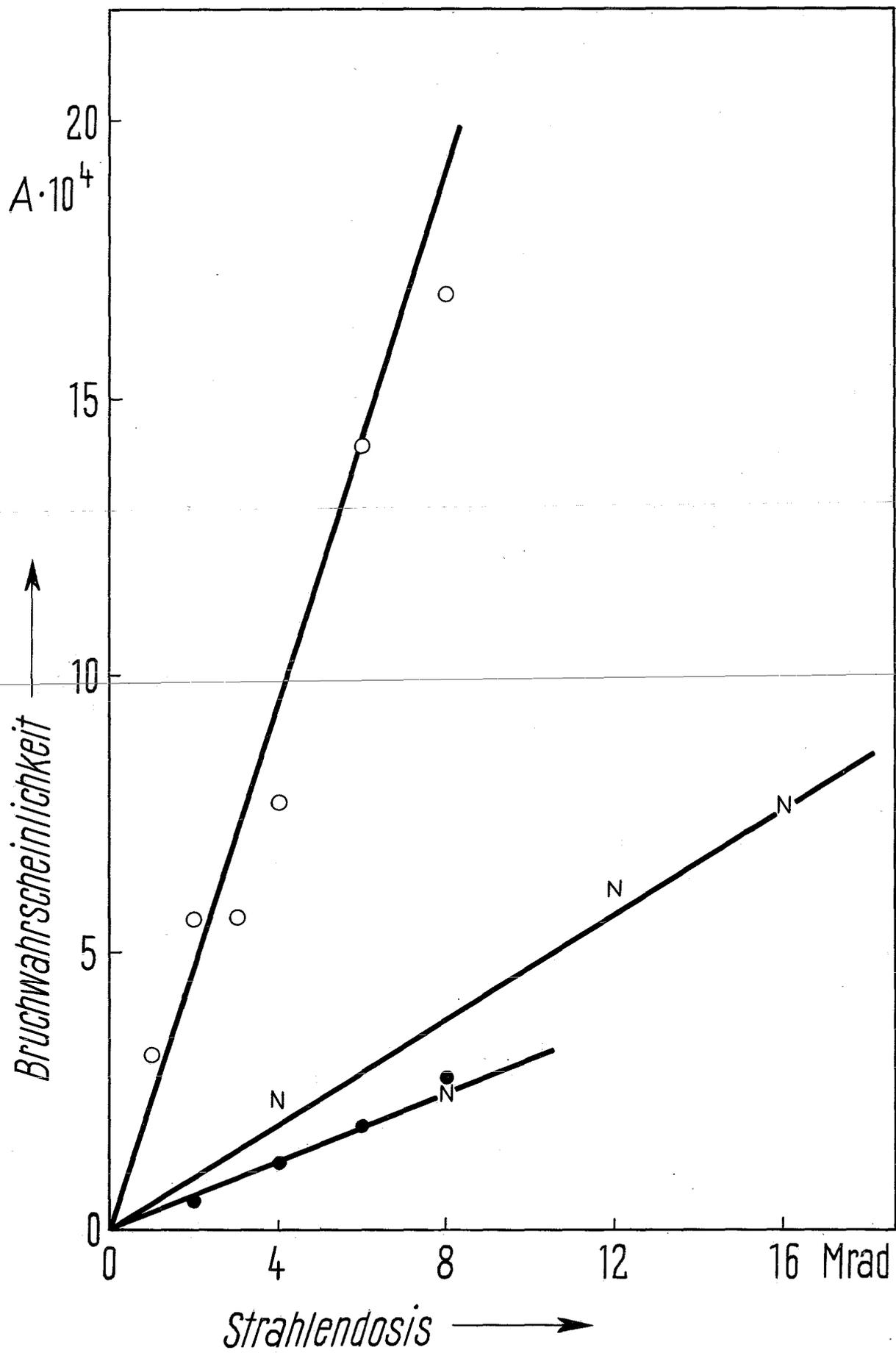


Abb. 9: Beziehung zwischen Bruchwahrscheinlichkeit α (Einzelbruch) und Strahlendosis von DNS im trockenen Nukleoprotein unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen. Die ausgezogenen Linien ergeben sich aus der mittleren Bruchwahrscheinlichkeit pro Dosis. Messpunkte jeweils Mittelwerte aus vier Einzelmessungen.

- Vakuum
- N Stickstoff
- o Sauerstoff

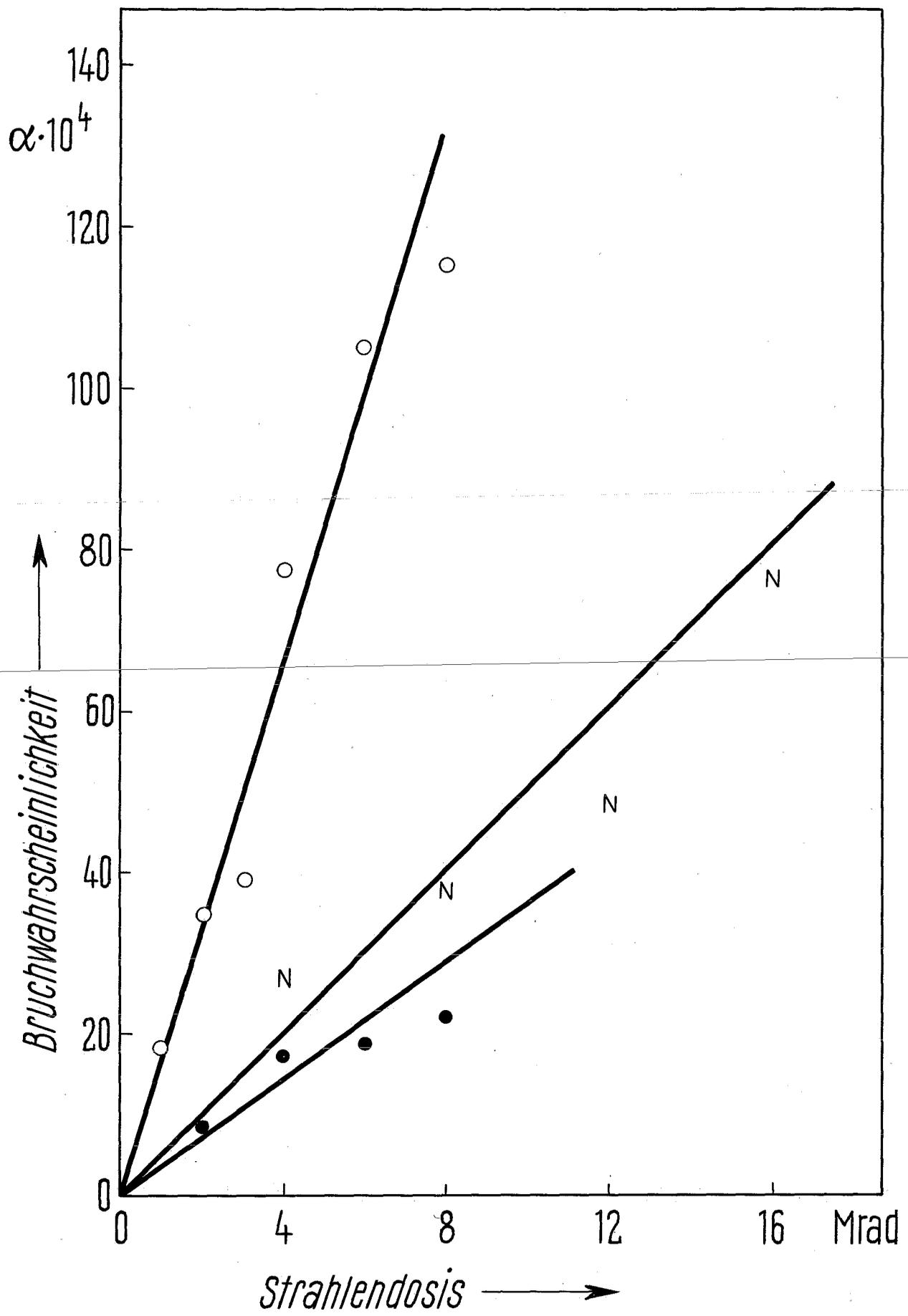


Abb. 10: Beziehung zwischen Vernetzungswahrscheinlichkeit und Strahlendosis von DNS im Nukleoprotein-gel (65 % Feuchtigkeit). Messpunkte jeweils Mittelwerte aus vier Einzelmessungen.

- Vernetzungswahrscheinlichkeit Ω
(zwischen den Doppelsträngen)
- Vernetzungswahrscheinlichkeit ω
(zwischen den Einzelsträngen)

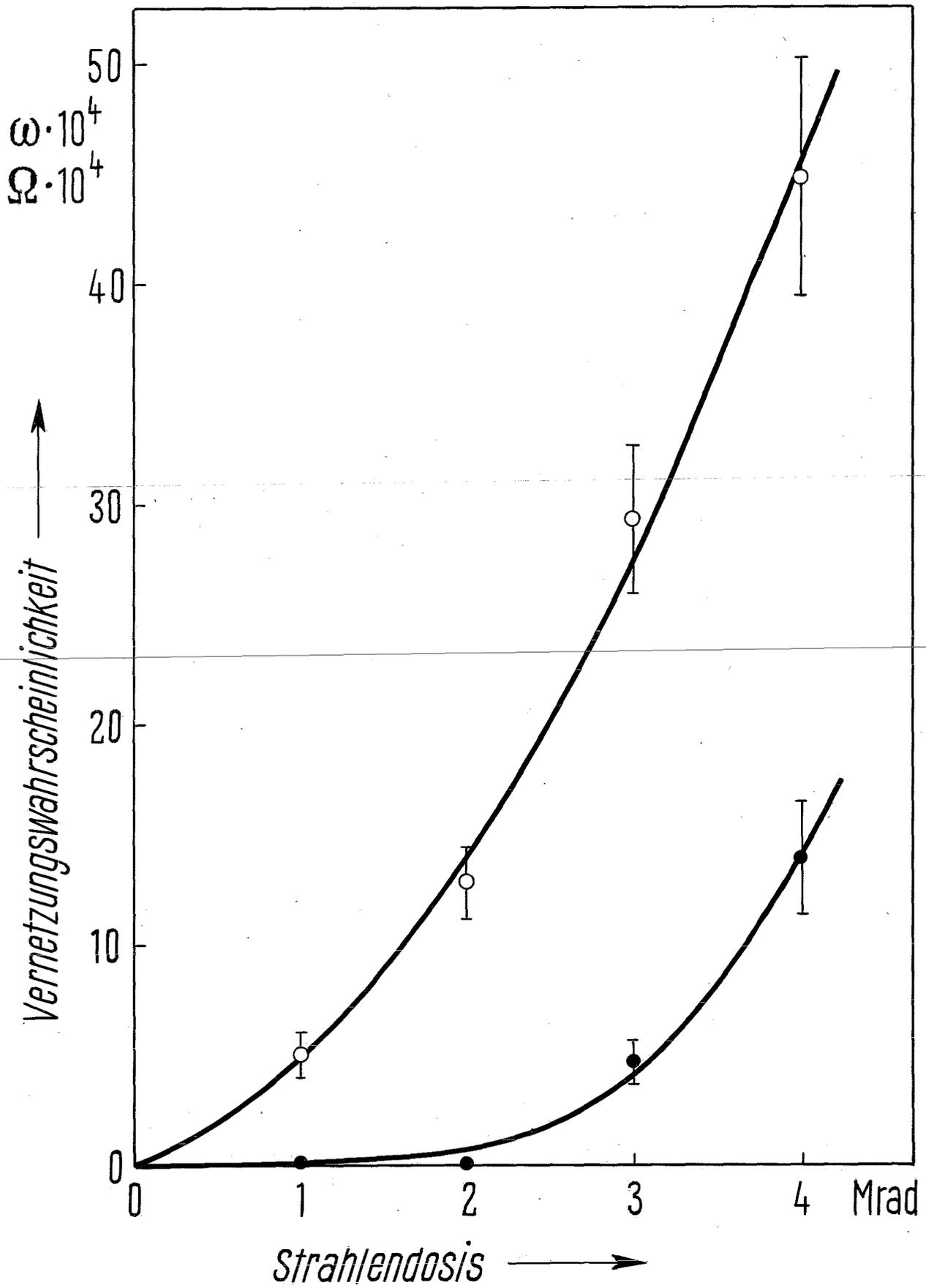


Abb. 11: Beziehung zwischen Vernetzungswahrscheinlichkeit Ω zwischen den Doppelsträngen und Strahlendosis von nativer DNS im trockenen Nukleoprotein unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen. Die ausgezogenen Linien ergeben sich aus der mittleren Vernetzungswahrscheinlichkeit pro Dosis. Messpunkte jeweils Mittelwerte aus vier Einzelmessungen.

- Vakuum
- N Stickstoff
- o Sauerstoff

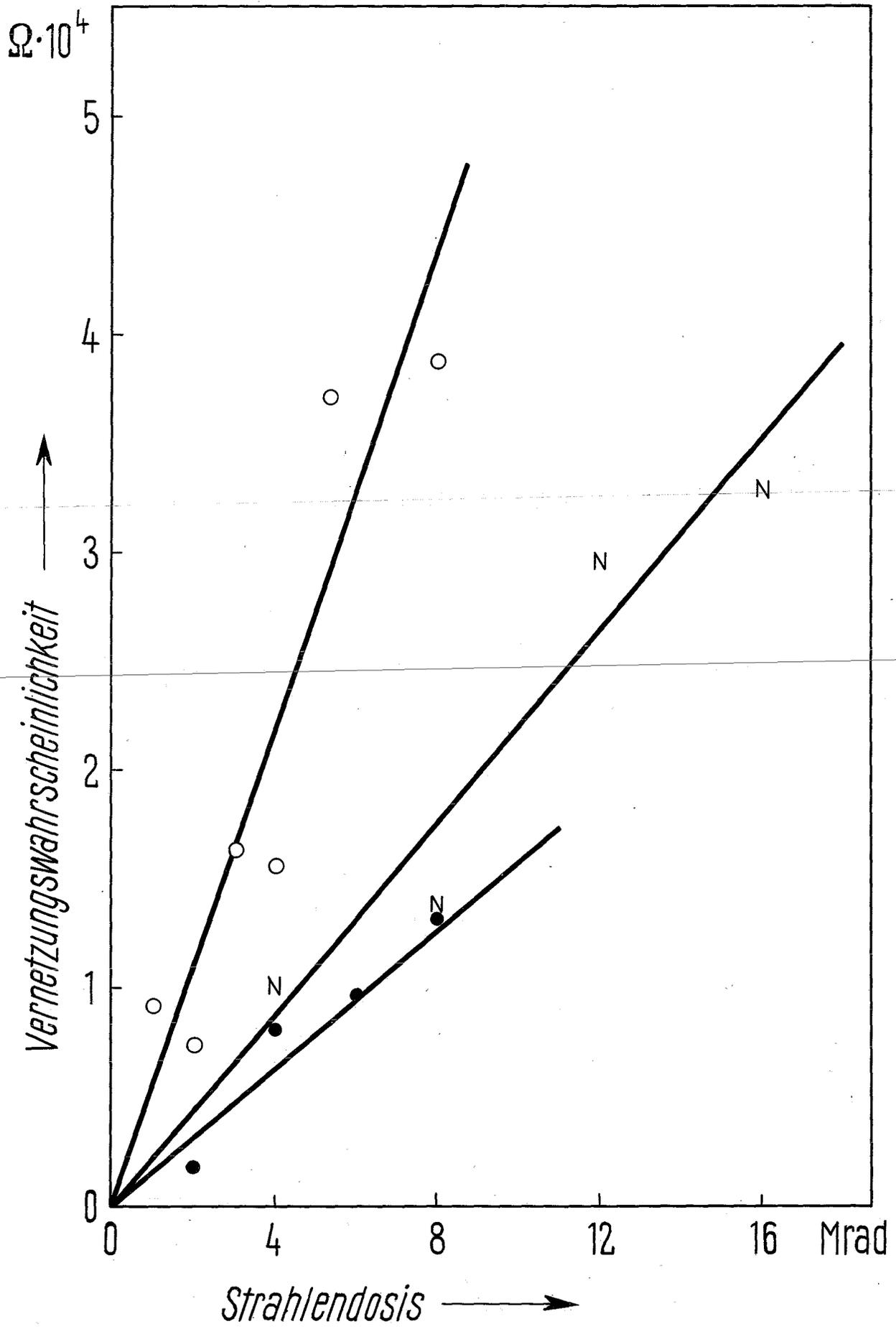


Abb. 12: Beziehung zwischen Vernetzungswahrscheinlichkeit ω zwischen den Einzelsträngen und Strahlendosis von denaturierter DNS im trockenen Nukleoprotein unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen. Die ausgezogenen Linien ergeben sich aus der mittleren Vernetzungswahrscheinlichkeit pro Dosis. Messpunkte jeweils Mittelwerte aus vier Einzelmessungen.

- Vakuum
- N Stickstoff
- o Sauerstoff

