

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

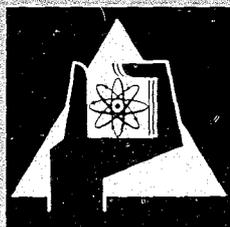
September 1968

KFK 861

Institut für Strahlenbiologie

Über die Strahlenempfindlichkeit der Wasserstoffbrücken
in der Desoxyribonucleinsäure

M. Ullrich, U. Hagen



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.
KARLSRUHE



Über die Strahlenempfindlichkeit der Wasserstoffbrücken in der Desoxyribonucleinsäure

M. ULLRICH und U. HAGEN

Über die Strahlenempfindlichkeit der Wasserstoffbrücken in der Desoxyribonucleinsäure

M. ULLRICH und U. HAGEN

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforschg. 23 b, 1176—1183 [1968]; eingegangen am 11. April 1968)

Calf thymus DNA was irradiated in aqueous solution and fractionated on columns of kieselgur with methylated serum albumin (MAK). Irradiated DNA was firmly bound by the MAK-column in neutral pH, exponentially to the radiation-dose; it could be eluted, however with 2 N-ammonia. There is only a limited region of the DNA-molecule, which is responsible for the retention, as the irradiated DNA-molecules could be degraded by ultrasound to fragments which are retained by the column and to those which can be eluted.

Experiments with DNA, degraded by DNase or ultrasound, have shown, that breaks of the double helix or breaks of a single strand are not responsible for this retention. Crosslinks between the molecules or alterations of the nucleotide bases could as well be excluded.

The sensitivity of the DNA concerning the observed radiation effect depends on the ionic strength of the solution during irradiation. In 0.4 M NaCl, where the helical structure of the DNA is more stable, the radiosensitivity is lower than in 0.01 M NaCl. This leads to the conclusion, that short single stranded regions are formed by irradiation and are responsible for the binding by the column. The denatured regions in irradiated DNA can not be recognized, however, by alteration of absorbancy-temperature relationships. The size of these regions in the DNA-chain and the mechanism of their formation is discussed.

Ionisierende Strahlen vermögen die Wasserstoffbindungen von nativer, doppelsträngiger DNS zu öffnen. Cox u. a.¹ zeigten, daß die titrierbaren basischen Gruppen im Molekül mit steigenden Strahlendosen zunehmen. Auch auf Grund der Beobachtung eines Anstiegs der Extinktion bei 260 nm nach Bestrahlung konnte man auf eine Denaturierung schließen². Weiter wurde versucht, aus der Änderung der Extinktion bei verschiedenem pH-Wert die Zahl der aufgebrochenen Wasserstoffbindungen pro 100 eV absorbiertes Strahlenenergie zu berechnen³. HAGEN u. a.^{4,5} untersuchten diese strahlenbedingte Denaturierung an DNS-Lösungen unter Heranziehung mehrerer Kriterien. Aus der Verschiebung des Absorptionsmaximums, der Erniedrigung des Schmelzpunktes und der Anlagerung von Formaldehyd an die bestrahlte DNS ließ sich berechnen, daß zwischen 3,8 bis 24,1 Wasserstoffbrücken pro 100 eV absorbiertes Strahlenenergie aufgebrochen werden.

Diese Berechnungen ließen jedoch unberücksichtigt, ob einzelne Moleküle vollständig, andere dagegen nicht denaturiert sind oder ob in der bestrahl-

ten Lösung partiell denaturierte DNS-Moleküle vorliegen.

HERSHEY u. a.⁶ zufolge ist die Chromatographie an Säulen aus methyliertem Albumin auf Kieselgur (MAK) besonders zur Trennung nativer und denaturierter DNS-Moleküle geeignet. Wie die vorliegenden Experimente zeigen, können mit Hilfe der Fraktionierung an der MAK-Säule am bestrahlten DNS-Molekül begrenzte Abschnitte mit zerstörten Wasserstoffbindungen nachgewiesen werden. Sie seien im folgenden als „denaturierte Zonen“ bezeichnet. Für die biologische Funktion der DNS in bestrahlten Zellen können solche Strukturveränderungen von Bedeutung sein, zumal sie den natürlichen Replikationsstellen in einer DNS sehr ähnlich sind.

I. Methoden

Gewinnung der DNS und Qualitätsprüfungen

Die DNS wurde aus Kalbsthymus, wie früher ausführlich beschrieben⁷ in Anlehnung an das Verfahren von COLTER u. a.⁸ mit Phenol isoliert. Die Konzentra-

¹ R. A. COX, W. G. OVEREND, R. A. PEACOCKE u. S. WILSON, Proc. Roy. Soc. [London] **149**, 511 [1958].

² P. EMMERSON, G. SCHOLES, D. H. THOMSON, J. F. WARD u. J. J. WEISS, Nature [London] **187**, 319 [1960].

³ B. COLLYNS, S. OKADA, G. SCHOLES, J. J. WEISS u. C. M. WHEELER, Radiat. Res. **25**, 526 [1965].

⁴ U. HAGEN, Nature [London] **194**, 182 [1962].

⁵ U. HAGEN u. R. WILD, Strahlentherapie **124**, 215 [1964].

⁶ A. D. HERSHEY, E. GOLDBERG, E. BURGI u. L. INGRAHAM, J. molecular Biol. **6**, 230 [1963].

⁷ U. HAGEN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **134**, 45 [1967].

⁸ J. S. COLTER, R. A. BROWN u. K. A. O. ELLEM, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **55**, 31 [1962].

tionsbestimmung der DNS-Lösung erfolgte mittels der Extinktion bei 260 nm. Der Extinktionskoeffizient der DNS betrug dabei $22,0 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$; er wurde aus der Bestimmung des Phosphatgehalts nach CHEN⁹ ermittelt. Falls die DNS in Phosphatpuffer gelöst war, führten wir die Desoxyribose-Bestimmung nach DISCHE¹⁰ in der Abwandlung nach BURTON¹¹ durch. Der Proteingehalt der DNS wurde nach LOWRY u. a.¹² bestimmt. Der RNS-Gehalt konnte nach der Vorschrift von VOKIN und COHN¹³ mit Orcinol ermittelt werden.

Viskositätsmessungen wurden an einem Drehviskosimeter nach HATSCHKE-COUPETTE¹⁴ durchgeführt. Sedimentationsmessungen mit der analytischen Ultrazentrifuge (Beckman Spinco E) und die Bestimmungen der Mol.-Gew. erfolgten nach den an anderer Stelle^{7, 15, 16} ausführlich beschriebenen Verfahren. Zur Berechnung der Brüche pro Molekül verwendeten wir nicht das Massennittel M_w , welches man aus der Sedimentationskonstanten bei 50% der DNS-Konzentration erhält, sondern das durch die Mol.-Gew.-Verteilung erhaltene Zahlenmittel M_n , das ein Maß für die mittlere Kettenlänge darstellt.

Bestrahlung

Die Bestrahlung der DNS geschah bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml in 0,01 M NaCl bei pH 7 in einer ⁶⁰Co- γ -Quelle mit der Dosisleistung von $6,5 \cdot 10^4$ R/h (Gammacell 200, Atomic Energy of Canada, Ltd.). Vor der Bestrahlung wurde 5 Min. lang ein Stickstoffstrom durch die Lösung geleitet.

Für die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht verwendeten wir einen Quecksilberniederdruckbrenner „Vykor“ der Fa. Gränzel, Karlsruhe. Proben von 5 ml DNS-Lösung der Konzentration von 0,2 mg/ml in 0,01 M NaCl wurden in einem rotierenden Quarzrohr mit UV-Licht der Wellenlänge 253,7 nm bestrahlt. Die in der Probe absorbierte Energie betrug bei der von uns durchgeführten Aktinometrie nach BOWEN¹⁷ $2,76 \cdot 10^6$ erg $\text{ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Degradierung

Die mechanische Degradierung geschah mit Hilfe des Branson-Ultraschall-Desintegrators „Sonifier“ bei einer Frequenz von 20 kHz. Die enzymatische Degradierung wurde mit Pankreas-Desoxyribonuclease I (Worthington, Code DPFF) in 0,01 M NaCl unter Zusatz von $0,5 \cdot 10^{-4}$ M $\text{MgCl}_2 + \text{MnCl}_2$ bei pH 7 durchgeführt. Die Reaktion von 0,1 μg Enzym/ml DNS-Lösung wurde im Drehviskosimeter verfolgt und bei der gewünschten Degradierung durch Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 1 M und Zugabe von Phenol unter-

brochen. Das Phenol wurde durch Ätherextraktion und Dialyse wieder entfernt.

Bestimmung des Schmelzpunktes

Der Schmelzpunkt (T_m) einer DNS-Probe wurde in einer heizbaren Quarzküvette im Spektralphotometer (Zeiss) bestimmt. Bei konstanter Aufheizgeschwindigkeit wurde die Extinktion kontinuierlich mit einem Schreiber gemessen und T_m graphisch ermittelt.

Adsorptionschromatographie

Für die Chromatographie an methyliertem Albumin auf Kieselgur (MAK) benutzten wir frittierte Chromatographierohre von 2 cm Durchmesser. Die etwa 4 cm hohe Säulenfüllung, die für jeden Versuch neu bereitet wurde, war für 1 mg DNS berechnet. Sie bestand aus folgenden Schichten: 1. 0,8 g gereinigte Cellulose, 2. 2,0 g gereinigtes Kieselgur + 0,5 ml 1-proz. methylierte Albuminlösung, 3. 1,5 g gereinigtes Kieselgur + 5 ml MAK-Suspension und 4. 0,5 g gereinigtes Kieselgur.

Die Reinigung der Cellulose und des Kieselgurs erfolgte nacheinander mit 1 N HCl, 0,5 N NaOH und 2 M NaCl. Bei der Methylierung des Albumins folgten wir der Vorschrift von HAYASHI u. a.¹⁸. Die MAK-Suspension entsprach der von MANDELL und HERSHEY¹⁹ beschriebenen. Alle Schichten wurden in 0,4 M NaCl + 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,7 eingefüllt und sowohl vor dem Auftragen der DNS als auch danach mit dieser Lösung gespült. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten aus 0,6 M bis 1,0 M NaCl + 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,7. Die Extinktion des Eluats wurde bei 260 nm in einem Uvicord (LKB, Schweden) kontinuierlich gemessen. Die Ausbeute einer Elution wird in % der Menge eluierter DNS zu aufgetragener DNS angegeben. Für die Darstellung der Abhängigkeit der Elution von Strahlendosis und Temperatur wird die mittlere Ausbeute des jeweils verwendeten unbehandelten DNS-Präparates gleich 100% gesetzt.

2. Ergebnisse

Die Eigenschaften unserer DNS-Präparate bei der Chromatographie an der MAK-Säule zeigt Tab. 1. Mit 0,4 M NaCl wird eine Fraktion eluiert, die zum größten Teil aus RNS und aus geringen Mengen niedermolekularer DNS besteht. Die hochmolekulare DNS erhält man bei einer NaCl-Konzentration von 0,6–0,8 M. In einer früheren Arbeit⁷ wurde die

⁹ P. S. CHEN, T. Y. TORIBARA u. H. WARNER, *Analytic. Chem.* **28**, 1756 [1956].

¹⁰ Z. DISCHE, *Mikrochem.* **8**, 4 [1930].

¹¹ K. BURTON, *Biochem. J.* **62**, 315 [1956].

¹² O. H. LOWRY, N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 [1951].

¹³ E. VOKIN u. E. E. COHN, in: *Methods of Biochem. Analysis* **Vol. I**, 287, New York 1957.

¹⁴ E. HATSCHKE-COUPETTE, *Kolloid-Z.* **12**, 238 [1913].

¹⁵ U. HAGEN u. H. WELLSTEIN, *Strahlentherapie* **128**, 565 [1965].

¹⁶ L. BOHNE, T. COQUERELLE u. U. HAGEN, *Studia biophys.*, im Druck.

¹⁷ E. J. BOWEN, in: *The chemical Aspects of Light*, Oxford Univ. Press, New York 1949.

¹⁸ M. N. HAYASHI, M. HAYASHI u. S. SPIEGELMAN, *Biophysic. J.* **5**, 231 [1965].

¹⁹ J. D. MANDELL u. A. D. HERSHEY, *Analyt. Biochem.* [New York] **1**, 66 [1960].

DNS in diesem Bereich stufenweise eluiert und die einzelnen Fraktionen mit Hilfe der Sedimentationsanalyse charakterisiert. Im Gegensatz dazu wurde in den vorliegenden Versuchen ein linearer Gradient benutzt, da vor allem die Gesamtmenge der eluierten DNS interessierte. Die Hauptfraktion, die zwischen 0,7 und 0,8 M NaCl erhalten wurde, betrug 60 bis 80% der aufgetragenen DNS-Menge. Die Ausbeute an degradiierter DNS war höher, dagegen wurde thermisch denaturierte DNS vollständig auf der Säule zurückgehalten.

Präp. Nr.	Viskosität [η] [dl/g]	Elutionsmenge in % aufgetragener DNS	
		in 0,4 M NaCl	in 0,7–0,8 M NaCl
<i>Nativ, unbehandelt</i>			
11	140	8,4	71,6
15	—	4,5	58,0
18	130	8,8	82,0
21	120	0,0	66,0
25	40	0,0	80,0
31	110	10,4	57,0
40	170	7,8	62,5
47	94	2,4	71,5
48	—	3,9	72,2
50	99	5,9	69,8
<i>Nativ, mit Ultraschall degradiert</i>			
15	21	5,7	78,0
21	11	3,6	93,0
31	—	11,3	74,5
<i>Denaturiert, 10 Min. 90 °C</i>			
18	—	8,8	0,0
40	18	11,9	0,0
53	—	8,9	0,0

Tab. 1. Chromatographie einiger DNS-Präparationen an Säulen aus methyliertem Albumin auf Kieselgur. Der Proteingehalt der Präparationen betrug 2–3%, der RNS-Gehalt 4–8 Prozent.

Chromatographiert man bestrahlte DNS, so ergibt sich, daß sie in einem exponentiellen Verhältnis zur Strahlendosis fest an die Säulenfüllung gebunden wird (Abb. 1). Eluiert man die Säulen anschließend mit 1,5 M NaCl in 0,1 M Trispuffer, pH 8, und dann mit 1,5 M NaCl in 2 N NH₃ (i. c.²⁰), so läßt sich die gebundene DNS-Fraktion wieder vollständig gewinnen. Die Abhängigkeit der bei pH 7 eluierbaren DNS-Menge von der absorbierten Dosis folgt formal einer Ein-Treffer-Kurve. Die Strahlenempfindlichkeit einer DNS-Probe kann somit durch die Dosis beschrieben werden, die zur Abnahme der Elution auf 37% der Kontrolle führt

²⁰ M. G. SMITH u. K. BURTON, *Biochem. J.* **98**, 229 [1966].

(D₃₇). Die D₃₇ für die Bindung an die MAK-Säule beträgt bei Bestrahlung der DNS in 0,01 M NaCl 460 R und bei Bestrahlung in 0,4 M NaCl 1100 R.

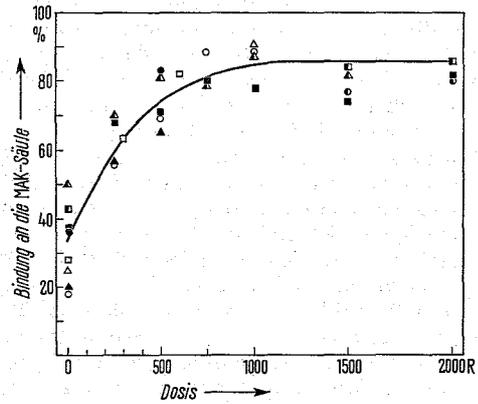


Abb. 1. Bindung bestrahlter DNS an die MAK-Säule. Konzentration bei der Bestrahlung (⁶⁰Co-γ-Strahlen): 0,5 mg/ml 0,01 M NaCl. Dargestellt sind Werte aus 9 DNS-Präparationen.

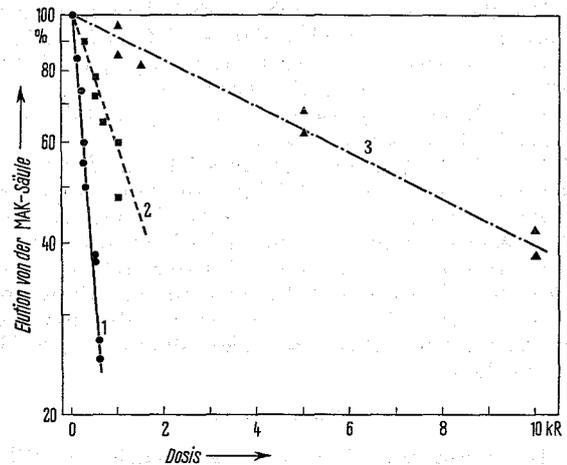


Abb. 2. Elution bestrahlter DNS von der MAK-Säule. Der Wert unbestrahlter DNS ist gleich 100% gesetzt. Die Bestrahlungsbedingungen sind die gleichen wie in Abb. 1. —●—●— hochmolekulare DNS ($M_w=10^7$) $D_{37}=460$ R. —■—■— DNS, degradiert nach Bestrahlung ($M_w=2,5 \cdot 10^6$) $D_{37}=1880$ R. —▲—▲— DNS, degradiert vor Bestrahlung ($M_w=2,5 \cdot 10^6$) $D_{37}=11,2$ kR.

Degradiert man die DNS nach der Bestrahlung mit Ultraschall auf ein Viertel ihres Mol.-Gew., so erhöht sich die Elution auf das Vierfache, die D₃₇ beträgt entsprechend 1880 R (Abb. 2, Kurve 2). Diese bessere Eluierbarkeit der bestrahlten DNS nach einer Degradierung besagt, daß dabei das Molekül in geschädigte und ungeschädigte Abschnitte zerlegt wird. Degradiert man die DNS bereits vor der Bestrahlung, so wird die Dosiswirkungskurve noch

wesentlich flacher, die D_{37} erhöht sich auf 11,2 kR (Abb. 2, Kurve 3). Dies besagt, daß degradierte DNS, deren Mol.-Gew. auf ein Viertel reduziert worden war, in bezug auf den mit der Chromatographie erkennbaren Strahlenschaden wesentlich resistenter ist als unbehandelte DNS.

Da ionisierende Strahlen an der DNS die verschiedensten Veränderungen der molekularen Struktur hervorrufen, war im einzelnen zu prüfen, welche von ihnen die Bindung an die MAK-Säule verursacht. Durch Behandlung der DNS mit verschiedenen wirkenden Agenzien konnten hierfür Hinweise gewonnen werden. Die wichtigsten Veränderungen der DNS-Struktur nach Bestrahlung sind Brüche in der Doppelhelix⁷, Brüche in der Einzelkette⁷, Vernetzungen zwischen den einzelnen Molekülen¹⁵, Zerstörung der Nucleotidbasen²¹ und die Öffnung der Wasserstoffbindungen¹⁻⁵ zwischen den beiden Strängen.

Brüche der Doppelhelix kommen als Ursache der Bindung an die MAK-Säule nicht in Betracht, da DNS, die mit Ultraschall degradiert wurde, besser von der Säule eluiert werden konnte als unbehandelte DNS (Tabn. 1 und 2). Dagegen könnte der Bruch einer der beiden Nucleotidstränge in der Doppelhelix diese Bindung verursachen. Um die Rolle dieser Einzelbrüche bei der Bindung an die MAK-Säule zu studieren, untersuchten wir die Eluierbar-

keit von DNS nach kurzer Behandlung mit Desoxyribonuclease. Hierbei entstehen neben Brüchen der Doppelkette auch zahlreiche Einzelbrüche. Tab. 2 gibt eine Übersicht über die Mol.-Gew. nativer und denaturierter DNS und über die Zahl der durch DNase einerseits und durch Ultraschall andererseits erzeugten Brüche. Bemerkenswert ist, daß in den mit Ultraschall degradierten Proben keine Brüche der Einzelkette nachgewiesen werden konnten.

Vergleicht man die Zahl der Einzelbrüche mit den Elutionswerten von der MAK-Säule, so ist keine Beziehung zueinander festzustellen. Die Zahl der Einzelbrüche spielt also keine Rolle bei der Bindung an die Säule. Dies wird zusätzlich dadurch bestätigt, daß das Eluat einer bestrahlten Probe die gleiche Zahl von Einzelbrüchen aufweist wie die Probe vor der Fraktionierung, obwohl nur 18,3% der aufgetragenen Menge eluierten.

Vernetzungen zwischen den DNS-Molekülen sind nach Bestrahlung von trockener DNS¹⁵ sowie auch nach Bestrahlung von DNS-Lösungen beschrieben worden^{15, 16, 22, 23}. Bei Bestrahlung von konzentrierten DNS-Lösungen oder in Gelen ist ihre Entstehung begünstigt^{15, 23}. Wir bestrahlten deshalb DNS-Gele, in denen die Moleküle dicht gepackt vorliegen und prüften dann die Bindung dieser DNS-Präparate an die MAK-Säule. Bei der Konzentration von 5 mg

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

Tab. 2. Mol.-Gew. degradiertes DNS, die Bestimmung von Einzelbrüchen und die Elution von der MAK-Säule.

²¹ J. J. WEISS, Progress in Nucleic Acid. Res. 3, 103 [1964].

²² N. N. DAS GUPTA, M. SARKAR u. D. N. MISRA, J. molecular Biol. 15, 619 [1966].

²³ P. ALEXANDER u. J. T. LETT, Nature [London] 187, 933 [1960].

/ml ergab sich eine D_{37} von 11,5 kR, bei 10 mg/ml eine D_{37} von 50 kR (Abb. 3).

Bei Viskositätsmessungen²⁴ ergab sich in dem Bereich von 0,2 – 5 mg/ml eine lineare Beziehung zwischen der Konzentration der bestrahlten Lösung und der für einen bestimmten Effekt erforderlichen Strahlendosis. Nehmen wir dies auch für den Strahleneffekt an, der zur Bindung an die MAK-Säule führt,

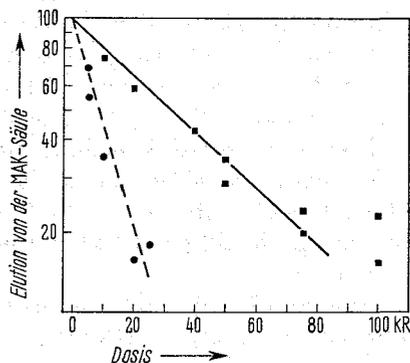


Abb. 3. Elution nach Bestrahlung von DNS-Gelen. —●—●— Konzentration bei der Bestrahlung: 5 mg/ml 0,01 M NaCl. —■—■— Konzentration bei der Bestrahlung: 10 mg/ml 0,01 M NaCl.

so ist nach einer Bestrahlung von 5 mg/ml eine D_{37} von 4,6 kR und von 10 mg/ml eine D_{37} von 9,2 kR zu erwarten. Tatsächlich wurden viel höhere Dosen gefunden. Dies besagt, daß das Ereignis, das für die Bindung der DNS an das methylierte Albumin verantwortlich ist, bei Bestrahlung in konzentrierter Lösung viel seltener auftritt als in verdünnter. Somit sind Vernetzungen als Ursache dieses Strahleneffekts wenig wahrscheinlich.

Die Bedeutung der durch die Strahlung zerstörten Nucleotidbasen für die Bindung an das methylierte Albumin prüften wir durch vergleichende Bestrahlung der DNS mit UV-Licht. Bekanntlich werden dabei die Basen wegen ihrer hohen Absorptionsfähigkeit in diesem Bereich bevorzugt geschädigt²⁵. Bestrahlungsversuche mit UV-Licht von 253,7 nm ergaben für die Elution eine D_{37} von $9,2 \cdot 10^6$ erg/ml (Abb. 4). Auf Grund von Extinktionsmessungen konnten wir erschließen, daß nach dieser UV-Dosis etwa 3,3% der Basen zerstört sind.

Dagegen kann man aus dem G -Wert für die Zerstörung der Basen in der DNS nach γ -Bestrahlung

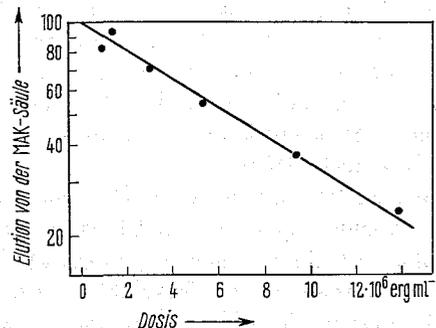


Abb. 4. Elution nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 253,7 nm. Konzentration: 0,2 mg/ml 0,01 M NaCl.

berechnen²¹, daß nach 460 R, der D_{37} für die Elution, nur 0,03% der Basen zerstört sind. Im Vergleich zu den Ergebnissen mit der UV-Bestrahlung erscheint dieser Anteil zu gering, um für die Bindung der DNS an die MAK-Säule primär verantwortlich zu sein.

Als Ursache des beobachteten Strahleneffekts konnten somit definierte Veränderungen der Struktur einzelner DNS-Bausteine, wie sie den Schäden der Nucleotidbasen sowie den Brüchen und Vernetzungen zugrunde liegen, ausgeschlossen werden. Die besondere Bindungsfähigkeit der denaturierten DNS an die MAK-Säule ließ nun vermuten, daß in der bestrahlten DNS umschriebene Abschnitte vorliegen, in denen die Nucleotidstränge voneinander getrennt sind. Diese führen dann zur Bindung des ganzen, sonst ungeschädigten DNS-Moleküls. Wie von HERSEY u. a.⁶ gezeigt wurde, entstehen solche Moleküle mit denaturierten Zonen auch unter Einwirkung von Scherkräften bei erhöhter Temperatur und können durch ihre Bindungsfähigkeit an methyliertes Albumin nachgewiesen werden.

Eine strahlenbedingte Öffnung der beiden Nucleotidstränge müßte dann auch von der Stabilität der Wasserstoffbrücken unter den jeweiligen Bestrahlungsbedingungen abhängen. Dies konnte bestätigt werden. So ist, wie oben erwähnt, die D_{37} in 0,01 M NaCl viel geringer als in 0,4 M, entsprechend dem viel geringeren Schmelzpunkt. In 0,01 M NaCl ermittelten wir 69 °C, in 0,4 M NaCl 88 °C. Ebenso verhält sich auch die Temperaturabhängigkeit der Elution (Abb. 5).

²⁴ U. HAGEN, unveröffentlicht.

²⁵ J. MARMUR, W. F. ANDERSON, L. MATTEWS, K. BERENS, E. GAJEWSKA, D. LANE u. P. DOTY, J. cellular comparat. Physiol. 58, 33 [1961].

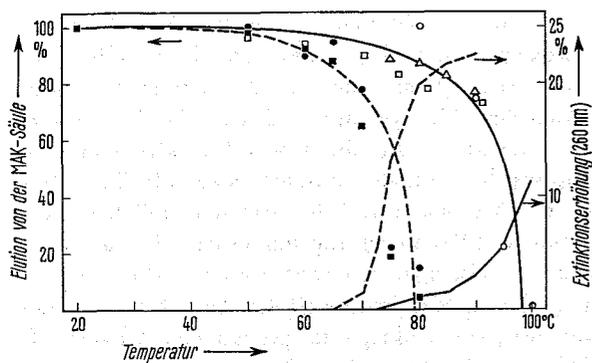


Abb. 5. Temperaturabhängigkeit der Elution. Konzentration: 0,5 mg/ml. Die Proben wurden 10 Min. bei der angegebenen Temperatur gehalten und dann rasch abgekühlt. Ionenstärke bei der Erwärmung: --- 0,01 M NaCl, ——— 0,4 M NaCl. Es sind Ergebnisse mit 5 DNS-Präparationen aufgetragen.

Die Proben wurden 10 Min. bei der angegebenen Temperatur inkubiert, rasch abgekühlt und anschließend auf ihre Eluierbarkeit geprüft. Gleichzeitig wurde bei diesen DNS-Proben die Erhöhung der Extinktion gemessen. Nach der Erwärmung fällt die Elutionsrate rasch ab, und zwar schon bevor eine Zunahme der Extinktion meßbar wird. Diese ist geringer als bei Messung des Schmelzpunktes, da bei der raschen Abkühlung eine partielle Renaturierung nicht zu vermeiden ist. INMAN²⁶ konnte an elektronenmikroskopischen Bildern zeigen, daß in diesem Temperaturbereich bereits eine partielle Denaturierung auftritt. Vergleicht man die Wirkung dieser Temperaturbehandlung auf die Elution in verschiedener Ionenkonzentration, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit der entsprechenden Erhöhung der Extinktion. Die Bindung der DNS hängt somit vom jeweiligen Zustand der Wasserstoffbindungen ab. Wir können annehmen, daß auch die erhöhte Bindung der DNS nach Bestrahlung auf einer partiellen Denaturierung der Wasserstoffbrücken beruht.

Diese umschriebenen denaturierten Zonen in einem DNS-Molekül lassen sich nicht mehr renaturieren. Kühlt man die DNS nach Erwärmung bis zum Schmelzpunkt langsam auf 57°C ab und hält sie bei dieser Temperatur drei Stdn., so läßt sich keine bessere Elution erzielen als nach raschem Abkühlen im Eisbad. Auch Renaturierungsversuche mit bestrahlter DNS waren ohne Erfolg. Dies ist in Übereinstimmung mit entsprechenden Versuchen von HERSHEY u. a.⁶, nach denen eine Renaturierung der

durch Scherkräfte erzeugten denaturierten Zonen nicht gelang.

Inkubiert man eine DNS-Probe für längere Zeit bei erhöhter Temperatur, so werden nicht nur Wasserstoffbindungen aufgespalten, sondern es werden auch Purinbasen freigesetzt²⁷. Gleichzeitig sinkt die Viskosität. Wir prüften die Wirkung einer solchen Behandlung auf die Elution an der MAK-Säule und bestimmten gleichzeitig die Erhöhung der Extinktion bei 260 nm sowie die Viskosität. Um die Ergebnisse mit denen von GREER und ZAMENHOF²⁷ vergleichen zu können, inkubierten wir bei 81°C. Die Ergebnisse zeigt Tab. 3.

Dauer der Inkubation [Stdn.]	Elution [%]	Extinktionserhöhung gemessen bei 20°C, 260 nm [%]	Viskosität [%]	Verlust an Purinbasen nach GREER u. ZAMENHOF ²⁷ [Mol-%]
0	100	0	100	0
1	91,8	4,5	54	0,2
2	74,9	5,4	43	0,4
3	—	5,7	35	0,6
4	54,5	—	—	0,8
5	50,8	—	30	1,0
16	52,4	13,1	6,5	3,2
24	42,1	—	—	4,8
27	—	—	7	5,4

Tab. 3. Zeitabhängiger Temperatureffekt auf die DNS. Gemessen an der Elution von der MAK-Säule, an der Extinktionserhöhung und an der Viskosität (Temperatur: 81°C, Konzentration: 0,5 mg/ml, Ionenstärke: 0,4 M NaCl, pH 7).

Aus der Erhöhung der Extinktion bei 260 nm folgt, daß nach längerer Inkubation bei 81°C eine partielle Denaturierung der Moleküle stattfindet. Entsprechend sinkt auch die Elutionsrate. Dies steht mit den Ergebnissen der Temperaturabhängigkeit der Elution (Abb. 5) in guter Übereinstimmung. Aus den oben dargestellten Versuchen an degradierter DNS wissen wir, daß die gleichzeitig stattfindende Abnahme der Viskosität allein keinen Einfluß auf die Elutionsrate hat. Der Verlust an Purinbasen ist durch die Inkubation bei 81°C relativ hoch; er ist viel höher als nach einer für die Abnahme der Elution vergleichbaren Dosis der γ -Bestrahlung. Am Beispiel einer solchen Depurinierung mit gleichzeitiger Degradierung und Denaturierung kann somit ebenfalls erkannt werden, daß die Abnahme der Elution an der MAK-Säule vornehmlich auf die Öffnung der Wasserstoffbindungen zwischen den beiden Nucleotidsträngen zurückzuführen ist.

²⁶ R. B. INMAN, J. molecular Biol. **18**, 464 [1966].

²⁷ S. GREER u. S. ZAMENHOF, Fedcat. Proc. **18**, 238 [1959].

Diskussion

Mit Hilfe der Chromatographie an methyliertem Albumin auf Kieselgur können bestrahlte DNS-Moleküle in zwei verschiedene Fraktionen getrennt werden. Die eine ist mit 0,6–0,8 M NaCl zu eluieren, die andere Fraktion mit 1,5 M NaCl in 2 N NH_3 . Es konnte nun gezeigt werden, daß diese, im neutralen pH-Bereich an die Säule gebundenen DNS-Moleküle einen kleinen Abschnitt voneinander getrennter Nucleotidstränge tragen. Mit gleichem Verfahren konnten SMITH und BURTON²⁰ die replikative DNS in einer phageninfizierten *E. coli*-Zelle von der übrigen DNS trennen. Sie führen diese Bindung der replikativen DNS an die MAK-Säule auf kleine Regionen einsträngiger DNS zurück.

Die Ausdehnung solcher denaturierter Zonen ist begrenzt, da man sie mit den Methoden, die vollständig denaturierte Moleküle erkennen lassen, nicht nachweisen kann. Zudem ist es möglich, das DNS-Molekül mit Ultraschall in verschiedene Abschnitte zu zerlegen, und zwar in solche, die denaturierte Zonen tragen und in andere, bei denen die Doppelhelix erhalten ist. Neben denaturierten Zonen entstehen im bestrahlten DNS-Molekül auch Brüche und Vernetzungen der Nucleotidstränge sowie Schäden der Nucleotidbasen. Wie unsere Versuche mit spezifisch wirkenden Agenzien (Ultraschall, DNase und UV-Licht) zeigten, kommen diese Veränderungen an einzelnen Bausteinen der DNS als alleinige Ursache der Bindung an das methylierte Albumin nicht in Betracht.

Die Häufigkeit einer strahlenbedingten denaturierten Zone läßt sich aus der Dosiseffektkurve ermitteln. Wir nehmen an, daß nach einer Dosis, die die Elution der DNS auf 37% der Kontrolle herabsetzt, im Mittel jedes Molekül einen solchen Abschnitt mit voneinander getrennten Nucleotidsträngen trägt. Bei DNS-Molekülen mit einem Mol.-Gew. von etwa 10^7 betrug die D_{37} 460 R, wenn bei 0,5 mg/ml bestrahlt wurde. Daraus errechnet sich ein G-Wert von 0,10 Ereignissen pro 100 eV absorbierter Energie. Der G-Wert für einen Bruch der Nucleotidkette beträgt dagegen etwa 0,4 (l. c.⁷) und für die Zerstörung einer Nucleotidbase etwa 1 (WEISS²¹). Das bedeutet, daß ein DNS-Molekül mit etwa 15 000 Nucleotidpaaren nach 460 R durchschnittlich eine denatu-

rierte Zone enthält und zusätzlich vier Brüche der Einzelkette sowie zehn geschädigte Nucleotidbasen.

Die Ausdehnung einer strahlenbedingten denaturierten Zone läßt sich nur schätzen. Die kleinste partielle Denaturierung, die INMAN²⁶ elektronenmikroskopisch beobachtete, umfaßt etwa 60 Nucleotidpaare. PEACOCKE u. a.²⁸ berechneten, daß bei einer thermischen Denaturierung mindestens 20 Nucleotidpaare voneinander getrennt werden. Die Ausdehnung der strahlenbedingten lokalen Denaturierung läßt sich aus der Menge der gespaltenen Wasserstoffbindungen ermitteln, die mit verschiedenen Denaturierungskriterien gemessen werden kann. Allerdings liefern diese Kriterien nur nach relativ hohen Dosen zuverlässige Werte. Wie früher gezeigt wurde⁵, erhält man als G-Wert für die Öffnung einer Wasserstoffbindung 3,8–24,1, wobei nach kleinen Dosen die Ausbeute gering ist, nach höheren Dosen größer wird. Rechnet man mit einem G-Wert von 5, dann sind in einer denaturierten Zone 50 Wasserstoffbindungen geöffnet oder 20 Nucleotidpaare voneinander getrennt.

Das Zustandekommen solcher lokal denaturierter Zonen in der bestrahlten DNS läßt sich möglicherweise nach einem von PLATZMAN und FRANCK²⁹ diskutierten Mechanismus verstehen. Durch plötzlich auftretende elektrische Ladungen im Innern eines Makromoleküls bei der Energieabsorption werden die polarisierbaren Seitengruppen derart ausgerichtet, daß mehrere schwache Bindungen, z. B. Wasserstoffbrücken, simultan aufbrechen. Diese Vorstellungen sind allerdings für die direkte Strahlenwirkung entwickelt worden. Es ist vielleicht möglich, daß ähnliche Reaktionen von Radikalen ausgehen, die bei Bestrahlung in wäßriger Lösung entstehen. In diesem Fall würde in einer denaturierten Zone auch immer eine Nucleotidbase geschädigt sein.

Es ist aber auch denkbar, daß eine umschriebene Trennung der beiden Nucleotidstränge nur dann eintritt, wenn eine Nucleotidbase innerhalb einer bestimmten Basensequenz geschädigt wird oder benachbart zu einem Einzelbruch. Auf diese Weise ließe sich erklären, daß denaturierte Zonen viel seltener auftreten als Brüche der Einzelkette und Strukturveränderungen an den Nucleotidbasen. Bevor nicht nähere Aussagen über die Häufigkeit der verschiedenen Schäden der Nucleotidbasen möglich

²⁸ A. R. PEACOCKE u. J. O. WALKER, *J. molecular Biol.* **5**, 550 [1962].

²⁹ R. PLATZMAN u. J. FRANCK, in: *Symposium on Information Theory in Biology*, Pergamon Press, London 1958.

sind, lassen sich hierzu keine endgültigen Aussagen machen.

Die denaturierten Zonen in der bestrahlten DNS könnten auch auf der Wirkung der H_3O^+ -Ionen beruhen, die in wäßrigen Lösungen im Bereich der Primärlionisation entstehen. Sie setzen für kurze Zeit in einem umschriebenen Bereich den pH-Wert der Lösung herab. In diesem Bereich könnten nun die Wasserstoffbindungen der DNS aufbrechen, ebenso wie eine Erniedrigung des pH-Wertes der Lösung zur Denaturierung des gesamten DNS-Moleküls führt^{3, 30}.

SMITH und STEVENS³¹ haben auf diese Möglichkeit der Strahlenwirkung in wäßriger Lösung aufmerksam gemacht. Sie konnten die strahlenbedingte Hydrolyse von Diäthylacetal auf umschriebene pH-Veränderungen durch H_3O^+ -Ionen zurückführen. Der *G*-Wert für die Produkte der Acetalhydrolyse stieg annähernd linear mit der Konzentration der Lösung bis zu $4 \cdot 10^{-2}$ M an und blieb bei höherer Konzentration konstant. Bei $1,6 \cdot 10^{-3}$ M wurde ein *G*-Wert von 0,1 ermittelt. Dies entspricht der von uns ge-

messenen Häufigkeit denaturierter Zonen, wenn man die Konzentration der DNS-Lösung auf die Molarität des Monomers bezieht.

Die Bedeutung denaturierter Zonen in einem DNS-Molekül ergibt sich, wenn man die biologische Funktion der DNS betrachtet. Nach SMITH und BURTON²⁰ sind an der Replikationsstelle der DNS die beiden Nucleotidstränge voneinander getrennt, wobei die denaturierte Zone so ausgedehnt ist, daß Moleküle mit Replikationsstellen an der MAK-Säule gebunden werden. Auch die Bindung der RNS-Polymerase an die DNS hat eine lokale Denaturierung an dieser Stelle zur Voraussetzung (WALTER u. a.³²). Dementsprechend würden dann die strahlenbedingten denaturierten Zonen ebenfalls als Bindungsstellen für die RNS-Polymerase in Frage kommen. Eine solche erhöhte Bindungsfähigkeit von RNS-Polymerase an bestrahlte DNS konnte aus anderen Versuchen erschlossen werden³³. Der Zusammenhang zwischen der Bindung der RNS-Polymerase an die DNS und den denaturierten Zonen nach Bestrahlung soll an anderer Stelle dargestellt werden.

³⁰ K. KECK, Dissertation, Universität Freiburg 1966.

³¹ D. R. SMITH u. W. H. STEVENS, *Nature* [London] **200**, 66 [1963].

³² G. WALTER, W. ZILLIG, P. PALM u. E. FUCHS, Frühjahrstagung der Ges. f. Biol. Chemie, Tübingen 1967.

³³ H. KRÖGER u. L. SCHUCHMANN, *Biochem. Z.* **346**, 191 [1966].