



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

Institut für Chemie 1: Nuklearchemie

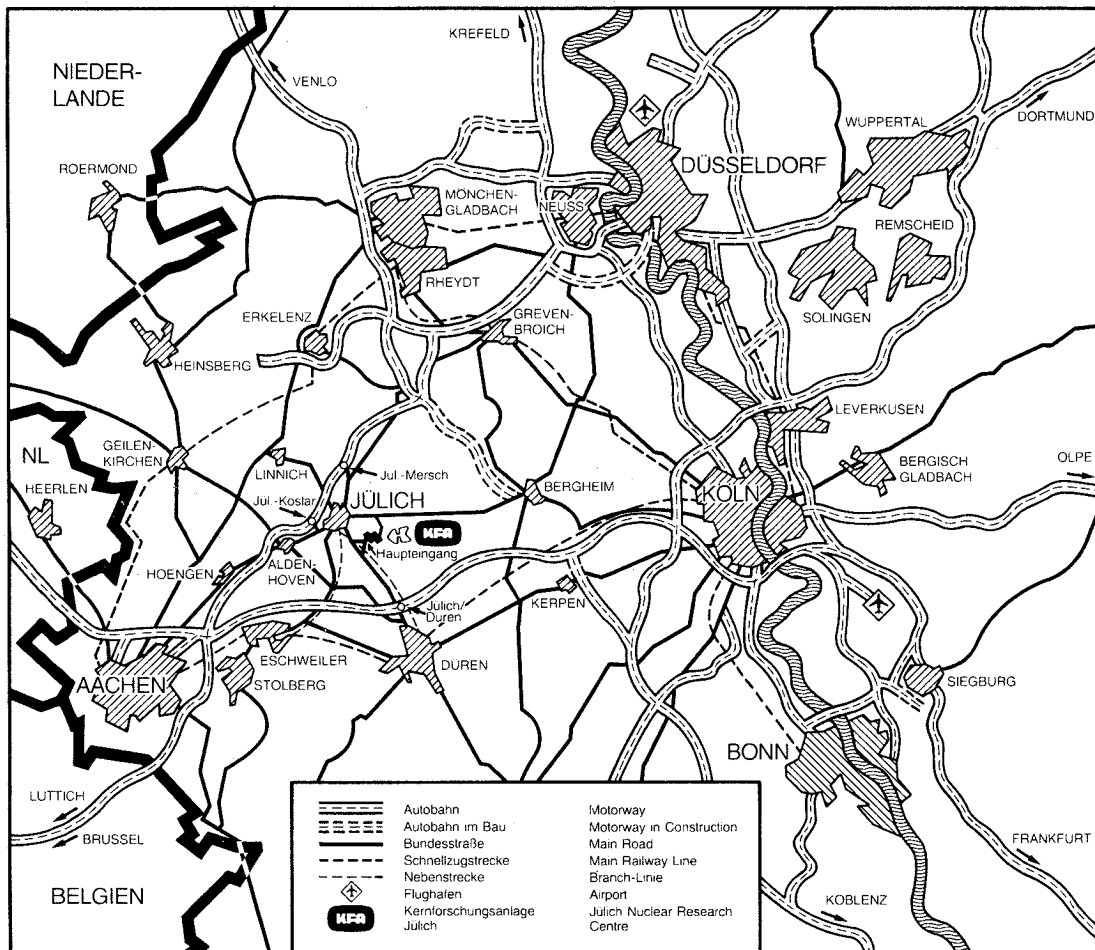
**Chemische und biologische
Folgen des radioaktiven Zerfalls
von Iod-125 in Plasmid-DNA**

von

U. Linz

**Jül - 1868
September 1983**

ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 1868

Institut für Chemie 1: Nuklearchemie Jül - 1868

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 02461/610 · Telex: 833 556-0 kf d

Chemische und biologische Folgen des radioaktiven Zerfalls von Iod-125 in Plasmid-DNA

von

U. Linz

*D 38 (Diss. Uni. Köln)

CHEMICAL AND BIOLOGICAL CONSEQUENCES OF THE RADIOACTIVE DECAY OF IODINE-125 IN PLASMID DNA

Abstract

The consequences of the decay of iodine-125 incorporated into DNA were studied on a molecular basis. Major emphasis was placed on the following questions: (i) the fate of the labelled nucleotide after the decay of the constituent ^{125}I atom, (ii) the spatial relationship between strand breaks and the position of the labelled nucleotide within the DNA strand and (iii) the specific products formed from strand breaks. Doubly (^{14}C and ^{125}I) labelled 5-iodo-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate (IdCTP) was synthesized and incorporated enzymatically into the SalI-cutting site of the plasmid pBR 322. Part of the radioiodinated DNA was treated with T4-DNA ligase in order to restore the circular structure of the native plasmid molecule.

After 4 months of storage under various conditions the stable end products were analyzed by radio GC, radio HPLC and electron microscopy.

As the decay not only leads to transmutation effects but also to radiolysis effects caused by the emitted electron, for comparison the experiments were not only carried out with doubly-labelled DNA but also with solutions of ^{14}C -labelled DNA containing Na^{125}I as internal radiation source.

The results clearly indicate that radiolysis alone causes only minor damage. Transmutation of the covalently bound iodine, on the other hand, leads to complete destruction of the labelled nucleotide, giving rise to $^{14}\text{CO}_2$ and ^{14}CO as main products.

The production of $^{14}\text{CO}_2$ which originates from both the base as well as the sugar component shows a strong solvent effect. This effect is discussed on the basis of two different mechanisms of fragmentation of the base and the sugar moiety.

The electron microscopy analysis of the DNA reveals that the local effects (destruction of the labelled nucleotide)

are always connected with at least one double strand break directly at the site of decay. In addition, one finds DNA double strand breaks in areas which are hundreds of base pairs apart from that site. Under certain circumstances most of the DNA molecules exhibit up to 10 breaks. The length distribution of the fragments is non-random. It is postulated that the appearance of double strand breaks far away from the iodine label is a consequence of the transfer of excitation energy via the common π -electron system within the DNA strand and that thymidine moieties serve as sinks for this energy. As a result, thymine-rich regions should be damaged preferably. A comparison between ligase-treated and untreated DNA shows that the configuration (linear or circular) of the DNA and the position of the labelled nucleotide within the DNA strand play an important role in the extent of the overall damage. After the decay of covalently-bound iodine-125, the remaining nucleotide is less heavily damaged when it is part of a ligase-treated DNA molecule. Moreover, such DNA shows less double strand breaks than untreated samples. Finally, it could be demonstrated that there is a linear correlation between gaseous fragmentation products and the number of double strand breaks.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2. ALLGEMEINE GRUNDLAGEN	6
2.1. Physikalische und chemische Konsequenzen des Elektroneneinfangs	6
2.2. Strahlenchemie des Wassers	14
2.3. Strahlenschäden an Nukleinsäuren und ihren Komponenten	17
2.4. Das Plasmid pBR 322: Herkunft, Struktur und Bedeutung für Molekularbiologie	23
3. EXPERIMENTELLES	25
3.1. Radiochemikalien und Reagenzien	25
3.2. Enzyme und Nukleinsäuren	26
3.3. Standardisierte Medien	26
3.4. Geräte	27
3.5. Bakterienzucht und Plasmidvermehrung	28
3.6. Plasmidisolierung	28
3.7. Plasmidreinigung	29
3.8. Enzymreaktionen	30
3.8.1. Spaltung mit Sal I Restriktionsendonuklease	30
3.8.2. DNA-Polymerase-Reaktion	30
3.8.3. DNA-Ligase-Reaktion	32
3.8.4. DNA-Hydrolyse mit DNase I und Nuklease S1	32
3. 9. Gelelektrophorese	32
3.10. Synthese von einfach- und doppeltmarkiertem 5-Iod-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat (IdCTP)	33
3.11. Reinheitsanforderungen	35
3.12. Probenaufteilung und -Aufbewahrung	35
3.13. Probenaufarbeitung	36
3.13.1. Gaschromatographische Trennungen	36
3.13.2. Flüssigkeitschromatographische Trennungen	37

	<u>Seite</u>
3.13.3. Elektronenmikroskopische Präparationen	42
3.13.4. Längenbestimmung von DNA-Molekülen	42
3.14. Radioaktivitätsmessungen	43
3.15. Bestimmung des Doppelmarkierungsgrades	43
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	44
4.1. Radiolyse	44
4.2. Chemische und biologische Effekte des Zerfalls von Iod-125 in DNA nach Einbau von [U- ¹⁴ C,5- ¹²⁵ I]-Iod-desoxycytidin	49
4.2.1. Untersuchungen an DNA-Proben ohne Ligase- behandlung	49
4.2.1.1. Gaschromatographie und HPLC	49
4.2.1.2. Elektronenmikroskopie	64
4.2.2. Untersuchungen an DNA-Proben mit Ligase- behandlung	79
4.2.3. Korrelation zwischen Gasentstehung und Doppelstrangbrüchen	91
5. ZUSAMMENFASSUNG	94
6. AUSBLICK	96
7. LITERATURVERZEICHNIS	98
8. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	107
9. VERZEICHNIS DER TABELLEN	110
10. ANHANG	111

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Schon bald nach der Entdeckung des Szilard-Chalmers Effektes [1] beobachtete man, daß Atome nach innerer Konversion [2,3], β -Zerfall [4,5] oder Elektroneneinfang [6] auch dann aus dem ursprünglichen Atomverband geschlagen werden können, wenn die Rückstoßenergien der vorangegangenen Kernreaktion nicht zur Spaltung chemischer Bindungen ausreichen. Als Ursachen dieser sogenannten Transmutationseffekte fand man elektronische Anregung und Ionisation des Tochteratoms; bei β -Zerfall und Elektroneneinfang zusätzlich dessen veränderte chemische Eigenschaften (z. Übersicht s. [7,8]).

Experimentell wählte man verschiedene Wege, um Zerfallseffekte von Radionukliden zu untersuchen. In den ersten Arbeiten wurden hauptsächlich Gasphasenexperimente durchgeführt. Die geladenen Zerfallsprodukte bestimmte man massenspektroskopisch [4-6]. Diese Methode liefert ein sehr genaues Bild der primären Zerfallsprodukte, ist aber nur bei flüchtigen Verbindungen anzuwenden und apparativ sehr aufwendig. Einen breiteren Anwendungsbereich hat dagegen die Doppelmarkierungstechnik [9-11]. Bei dieser Methode werden zwei radioaktive Atome in ein Molekül eingeführt. Nach Zerfall des einen läßt sich mit Hilfe des zweiten das Schicksal des Restmoleküls verfolgen, indem man die Zerfallsprodukte mit geeigneten Methoden trennt und radio-metrisch bestimmt.

Für Physiker und Chemiker gleichermaßen von Interesse sind seit vielen Jahren die Transmutationseffekte von Nukliden, die durch Elektroneneinfang (= EC oder K-Einfang) zerfallen. Bei dieser Art von Zerfall tritt praktisch immer der Auger-Effekt auf, d.h. der primären Leerstelle in der Elektronenhülle folgt eine Leerstellen-Kaskade, die zu einem vielfach positiv geladenen Tochterion führt. Iod-125 ist ein Beispiel für ein Nuklid, das durch Elektroneneinfang zerfällt. 1963 zeigten Carlson und White [6], daß der Zerfall von kovalent-gebundenem Iod-125 zumindest in der Gasphase für den Molekülrest drastische Konsequenzen hat und zu einer Art Molekül-

explosion führt. Deutzmann und Stöcklin [12] bestätigten diese starken Effekte auch für die kondensierte Phase. Sie zeigten darüberhinaus mit Hilfe der Doppelmarkierungstechnik erstmalig, daß dies im Fall einer wässrigen Lösung von [2-¹⁴C, 5-¹²⁵I]-Ioduracil zu einer völligen Fragmentierung des Uracilringes führt, wobei, anders als bei der Radiolyse, vorwiegend gasförmige Fragmentierungsprodukte wie CO und CO₂ entstehen.

Transmutationseffekte wurden auch von Strahlenbiologen relativ früh entdeckt (z. Übersicht s. [13]). Meist berücksichtigte man in der Strahlenbiologie jedoch lediglich den radiolytischen Anteil emittierter β - oder γ -Strahlung in Analogie zu den Effekten externer Röntgen- oder ⁶⁰Co- γ -Bestrahlung, da dieser gegenüber dem Transmutationsanteil oft stark überwiegt. Während die Schädigung durch externe Bestrahlung aber mehr oder weniger statistisch erfolgt, können nach Markierung mit weichen β -Strahlern (³H oder ¹⁴C) ganz lokale Schäden auftreten (z. Übersicht s. [14]). Auch Iod-125 läßt sich in biologisches Material einbauen, z.B. als Ioduracil oder Ioddesoxyuridin in DNA [15], wobei es die natürliche Base Thymin ersetzt. Am Anfang stand hauptsächlich die einfache Markierungsmöglichkeit und die gute Nachweisbarkeit des γ -emittierenden Isotops im Vordergrund. Sehr rasch entdeckte man aber, daß die mit dem Zerfall von Iod-125 verbundenen biologischen Schäden wesentlich stärker sind als die Zerfallseffekte anderer Nuklide wie z.B. ³H oder ³²P (z. Übersicht vgl. [16,17]). Ungeklärt blieb jedoch die Korrelation zwischen den biologischen Schäden und den erwähnten drastischen chemischen Primärreaktionen.

Hauptziel dieser Arbeit sollte es daher sein, auf molekularer Ebene Aufschluß über Ort und Art der DNA-Schädigung zu erhalten.

Die vorliegende Arbeit sollte Antworten zu folgenden Fragen liefern:

1. Was passiert mit dem Molekülrest eines Iod-125-markierten Nukleotids, das Teil eines DNA-Strangs ist, nach Zerfall des radioaktiven Atoms?

2. Finden die makroskopisch beobachteten (Doppel-)Strangbrüche am Ort des radioaktiven Zerfalls statt?
3. Wie groß ist die Reichweite der zerfallsinduzierten Schädigung?
4. Welche Rolle spielen radiolytische Effekte bei den verursachten Schäden?

Ansatz zur Beantwortung dieser Fragen sollte die Doppelmarkierung von DNA sein. Abb. 1 zeigt schematisch das hierzu geplante experimentelle Vorgehen.

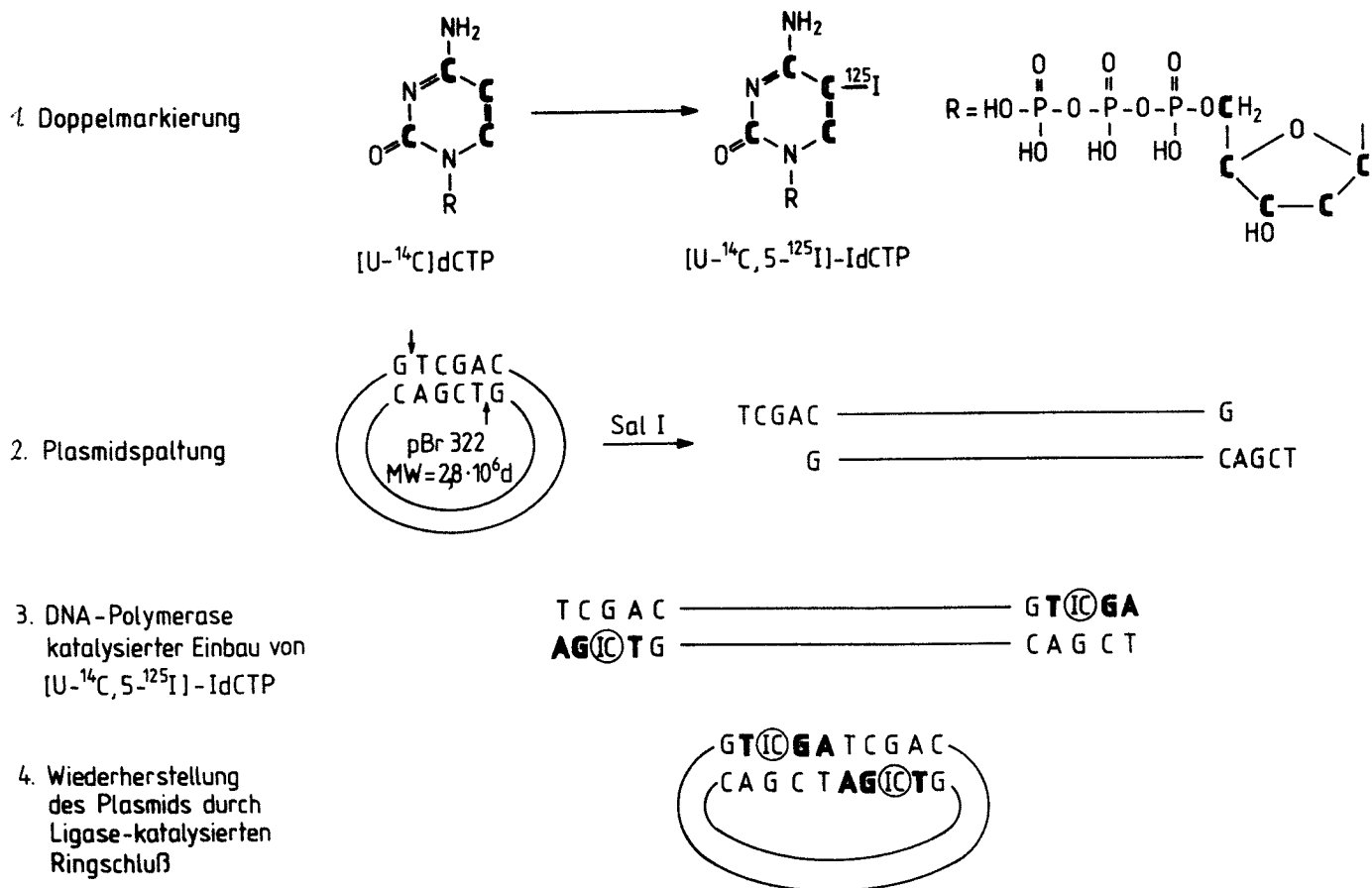


Abb. 1: Schematische Darstellung der experimentellen Schritte zur spezifischen Doppelmarkierung (^{14}C , ^{125}I) eines Plasmids.

Als DNA-Vorläufer sollte einfach (^{14}C)- und doppelt (^{14}C und ^{125}I)-markiertes Ioddesoxycytidintriphosphat (IdCTP) synthetisiert werden, das sich wie der natürliche DNA-Baustein Desoxycytidintriphosphat (dCTP) in DNA einbauen läßt [18]. Eingebaut werden sollte es in das Plasmid pBR 322. Mit einer Größe von $2.8 \cdot 10^6$ dalton [19] läßt sich diese DNA relativ problemlos isolieren und handhaben. Andererseits ist das Plasmid groß genug, um sich wie ein "echtes" Makromolekül mit Tertiärstruktur zu verhalten. Zu Beginn der Arbeit war auch schon dessen gesamte Nukleotidsequenz bekannt [20]. Damit war zumindest prinzipiell die Möglichkeit geschaffen, eventuelle Schäden aus der Struktur der betroffenen Region zu erklären. Die DNA-Sequenz von pBR 322 weist nur eine einzige Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym Sal I (Erkennungssequenz: $\begin{smallmatrix} \text{G}^{\downarrow} \text{TCGAC} \\ \text{CAGCT}^{\uparrow} \text{G} \end{smallmatrix}$) auf. Dieses Enzym schneidet die Einzelstränge eines DNA-Moleküls in der in Abb. 1 dargestellten Weise und liefert überhängende Einzelstrangenden ("sticky ends"), die als Matrize für die DNA-Synthese dienen können. Mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase sollten die (vier) fehlenden Nukleotide ergänzt werden, wobei markiertes Ioddesoxycytidin anstelle von Desoxycytidin eingebaut werden sollte.

Ein Teil der markierten DNA sollte in einem weiteren Schritt durch Behandlung mit T4-Ligase wieder zum Ring geschlossen werden. Zweck dieses Experiments sollte es sein, Doppelstrangbrüche elektronenmikroskopisch über die Abnahme des Anteils ringförmiger DNA-Moleküle zu verfolgen. Außerdem sollte geprüft werden, ob durch die veränderte Geometrie der DNA-Moleküle Art oder Ausmaß der DNA-Schädigung beeinflußt werden.

Da beim Zerfall von Iod-125 nicht nur Transmutationseffekte auftreten, sondern durch emittierte Elektronen auch radio-lytische Effekte zu erwarten sind, sollten alle Experimente außer mit doppeltmarkierten DNA-Proben auch mit einfach ^{14}C -markierter DNA durchgeführt werden, die Iod-125 in Form von Na^{125}I als interner Strahlenquelle in der Lösung enthielt.

Alle Proben sollten unter verschiedenen Bedingungen zur Akkumulierung von Iod-125-Zerfällen und damit Radiolyse- und Transmutationsprodukten mehrere Monate gelagert und schließlich mit Hilfe von Radio-Gaschromatographie, -Hochdruckflüssigkeitschromatographie und Elektronenmikroskopie analysiert werden.

Die Wahl der Lösungsmittel erfolgte unter folgenden Gesichtspunkten:

- es sollte ein Lösungsmittel verwendet werden, das keine starken Radikalfängereigenschaften besitzt und
- es sollte ein Medium Verwendung finden, das in etwa die Verhältnisse in der lebenden Zelle wiedergeben kann, und dennoch strahlenchemisch möglichst genau definiert ist.

Reines Wasser als Lösungsmittel würde dem ersten Kriterium genügen. Gegen dessen Verwendung spricht jedoch, daß es denaturierend auf die Doppelhelixstruktur von DNA wirkt [21]. NaCl verhält sich in neutraler wässriger Lösung radiolytisch inert [22] und verhindert die Denaturierung. Eine verdünnte NaCl-Lösung sollte deshalb eine bessere Alternative zu dem sehr einfachen System "Wasser" sein.

Phosphatpuffer wird häufig als "physiologisches" Lösungsmittel für biologisches Material benutzt. Auch in der Strahlenchemie von DNA in wässriger Lösung kommt Phosphatpuffer häufig zum Einsatz [22-24]. Dabei wurde in vielen Fällen eine Schutzwirkung gegenüber ionisierender Strahlung beobachtet, die darauf zurückzuführen ist, daß H_2PO_4^- -Ionen als Radikalfänger fungieren können [25,26].

Durch die zusätzliche Verwendung von Phosphatpuffer als Medium sollte daher geprüft werden, inwieweit die Produktbildung nach Zerfall von Iod-125 Lösungsmiteleinflüssen unterliegt und speziell, ob durch den begleitenden Auger-Effekt Radikalreaktionen induziert werden, in die Phosphationen als Fänger eingreifen können.

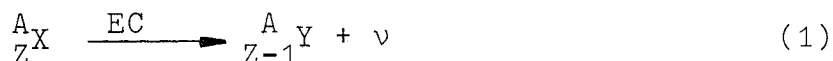
Als Gasatmosphären sollten alternativ reiner Stickstoff als Inertgas und Sauerstoff als Radikalfänger und oxidierendes Agens verwendet werden.

Im Verlauf dieser Arbeit lieferten Martin und Haseltine [27] eine erste Antwort zu der Frage nach der Reichweite von Iod-125-zerfallsinduzierten Schäden in DNA. Sie hatten kurze DNA-Fragmente ebenfalls mit ^{125}I -Ioddesoxycytidin an definierter Stelle markiert; zusätzlich aber auch noch ein Ende mit ^{32}P . Nach mehrwöchiger Lagerung trennten sie die ^{32}P -markierten Fragmente elektrophoretisch auf und verglichen sie mit Sequenzierungsprodukten des ursprünglichen, ungeschädigten Fragments. Sie fanden, daß jeder Zerfall eines Iod-125-Atoms mindestens einen Strangbruch produziert, daß sich mehr als 70 % der Strangbrüche in einem Bereich ereignen, der weniger als 15 Å (= 5 Nukleotide) vom Ort der Markierung entfernt ist und daß die maximale Reichweite eines Iod-125-zerfallsinduzierten Strangbruchs 70 Å beträgt. In Kapitel 4.2.1.2. wird noch einmal genauer auf diese Arbeit eingegangen werden.

2. ALLGEMEINE GRUNDLAGEN

2.1 Physikalische und chemische Konsequenzen des Elektroneneinfangs

Wie der Name schon sagt, fängt der Kern bei der nuklearen Elektroneneinfangreaktion ein Elektron der Atomhülle ein. Gleichzeitig wird ein Neutrino emittiert. Kernladung und Zahl der Elektronen nehmen dabei jeweils um eine Einheit ab.



Da das Atom bei der Umwandlung weder Elektronen verliert noch hinzugewinnt, ist die Energie des Neutrinos E_ν gegeben

durch

$$E_v = [m({}_Z^AX) - m({}_{Z-1}^AY)]c^2 - E_B - E_R. \quad (2)$$

Dabei ist m die Masse des Mutter(X)- bzw. Tochternuklids(Y), E_B die Bindungsenergie des eingefangenen Elektrons (im allg. von K- oder L-Schale) und E_R die Rückstoßenergie des Atoms.

Durch den Elektroneneinfang besitzt das Tochteratom eine innere Leerstelle in der Elektronenhülle. Die kann durch ein äußeres Elektron aufgefüllt werden. Die Differenz zwischen der Bindungsenergie des Elektrons in der inneren und der äußeren Schale (E_B und E_B') kann in Form charakteristischer Röntgenstrahlung abgegeben werden:

$$\Delta E = E_B - E_B' \quad (3)$$

Die Energie kann aber auch strahlungslos auf ein weiteres Elektron mit der Bindungsenergie E_B'' übertragen werden, so daß es zu dessen Emission kommt.

Die kinetische Energie des emittierten Elektrons beträgt

$$E_{kin} = \Delta E - E_B'' = E_B - (E_B' + E_B'') \quad (4)$$

Dieser Vorgang wird nach seinem Entdecker Auger-Effekt [28,29] genannt. Das freiwerdende Elektron heißt Auger-Elektron. Der beschriebene Ablauf kann sich in Form einer Kaskade so lange wiederholen, bis die Valenzschale erreicht ist. Je nach Größe des Atoms können auf diese Weise vielfach positiv geladene Ionen entstehen.

Abb. 2 zeigt schematisch eine solche Kaskade für ein Xe-Atom [30].

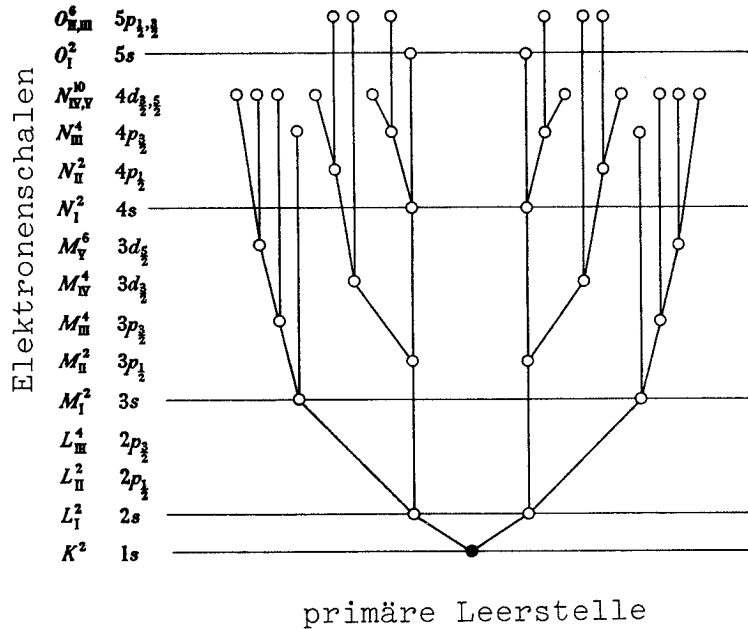


Abb. 2: Auger-Kaskade im Xe-Atom [30]

Der Anteil der Leerstellen in einer bestimmten Elektronenschale, der nach deren Auffüllung zur Emission von Auger-Elektronen führt, wird als Auger-Ausbeute bezeichnet. Der Anteil, der zur Aussendung eines Röntgenquants führt, heißt Fluoreszenzausbeute(W). Für die K-Schale gilt

$$W_K = \frac{1}{1 + aZ^{-4}} \quad (5)$$

Z ist die Ordnungszahl des Atoms, a eine Konstante. Die Fluoreszenzausbeute der K-Schale ist bei gleichem Z stets höher als die der L- und höheren Schalen; d.h. mit Fortschreiten der Kaskade nach außen gewinnt der Auger-Prozeß an Bedeutung. Bei Leerstellenkaskaden in schweren Atomen spielen auch Coster-Cronig-Übergänge eine Rolle, die sich vom Auger-Prozeß nur insofern unterscheiden, als dabei neue Leerstellen in Unterschalen produziert werden.

Was passiert, wenn der Auger-Effekt in einem molekular gebundenen Atom auftritt? Der gesamte Aufladungsprozeß erfolgt in

10^{-16} - 10^{-15} s, also rascher als eine Molekülschwingung (10^{-14} - 10^{-12} s). Der Molekülrest wird zunächst von der Kaskade unbeeinflusst bleiben. Wenn die Valenzschale durch die Aufladung eine größere Anzahl positiver Ladungen erhalten hat, wird eine intramolekulare Ladungsverteilung einsetzen, weil im allgemeinen das Ionisierungspotential des Molekülrests niedriger ist als das des vielfach positiv geladenen Atoms. Am Ende werden sich die positiven Ladungen an der Peripherie des Moleküls befinden und es wird aufgrund der hohen Coulomb-Abstoßung förmlich explodieren. In Abb. 3 ist dieses von Carlson und White [6] vorgeschlagene Modell schematisch dargestellt. Sie zeigten auch als erste, daß ihr Modell zumindest in der Gasphase gültig ist. Massenspektroskopisch bestimmten sie die Ladungsverteilung der Fragment-Ionen nach Zerfall von Iod-125 (Zerfallsschema von ^{125}Iod s. Abb. 4) in $\text{CH}_3^{125}\text{I}$ und $\text{C}_2\text{H}_5^{125}\text{I}$.

Sie fanden Te-Ionen mit bis zu 18 positiven Ladungen. Am häufigsten waren Te^{9+} - und Te^{10+} -Spezies. Daneben beobachteten sie eine Vielzahl von Kohlenstoff- und Kohlenstoff-Tellur-Fragment-Ionen (u.a. C^{2+} , C_2^+ , CH_3^+ , C_2H_5^+ , CH_3Te^+ und $\text{C}_2\text{H}_5\text{Te}^+$).

In der kondensierten Phase verliert das Modell wahrscheinlich seine Gültigkeit. Hier müssen rasche Ladungsneutralisation und elektronische Relaxation berücksichtigt werden. Wie stark die Umgebung eines zerfallenden Iod-125-Atoms dessen Elektronenspektrum beeinflusst, zeigten Charlton und Booz [33] mit einer Monte-Carlo-Rechnung. Die Zahl der emittierten Elektronen pro Zerfall variiert danach zwischen 1 und 47 (s. Abb. 5) die Gesamtelektronenenergie zwischen 0.7 und 67.2 keV (Abb. 6). Für die kondensierte Phase errechneten sie einen Mittelwert von 21.2 emittierten Elektronen und eine mittlere Elektronenenergie von 19.8 keV. Für die Gasphase lauten die entsprechenden Werte 13.2 und 19.3 keV.

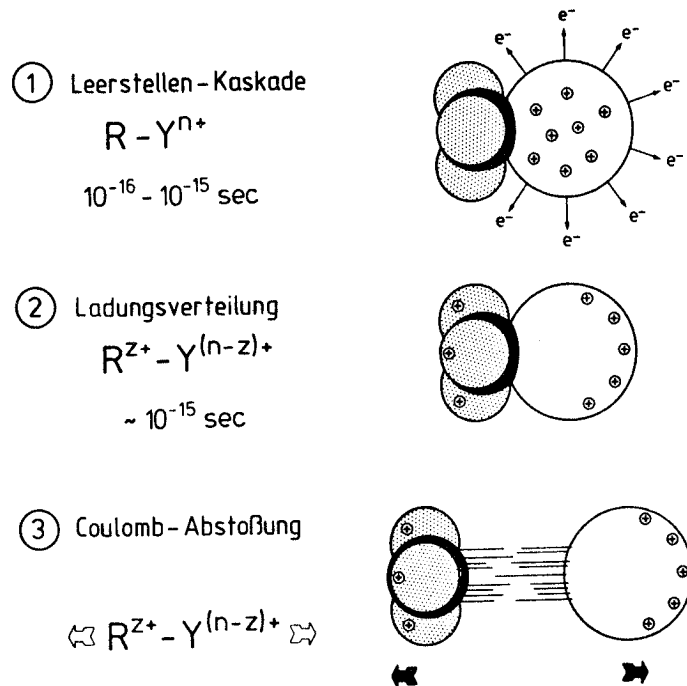


Abb. 3: Primäre physikalische und chemische Konsequenzen des Auger-Effektes (Molekülexplosion) an einem chemisch gebundenen Atom Y im Molekül RY in der Gasphase (aus [31])

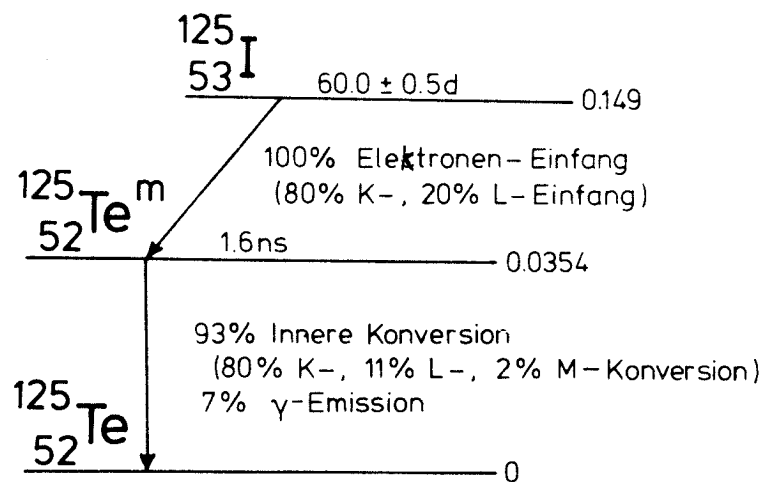


Abb. 4: Zerfallsschema von Iod-125 [32]

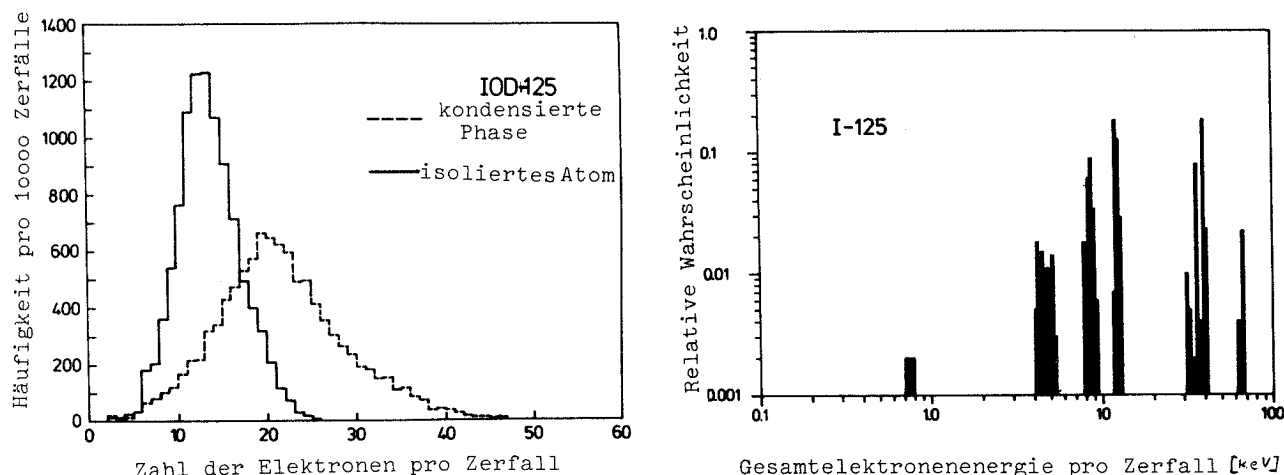


Abb. 5: Verteilung der Anzahl emittierter Elektronen pro Zerfall. Ein Vergleich zwischen kondensierter Phase und isoliertem Zustand [33]

Abb. 6: Verteilung der gesamten nach Iod-125-Zerfall freigesetzten Elektronenenergie [33]

Der Unterschied zwischen den Elektronenspektren läßt sich, den Autoren zufolge, direkt anhand des Zerfallsschemas von Iod-125 erklären (vgl. Abb. 4): Zwischen Elektroneneinfang und innerer Konversion liegt ein metastabiler Zustand mit einer Halbwertszeit von $1,6 \cdot 10^{-9}$ s. Für ein isoliertes Atom ist diese Zeit zu kurz, um die durch den Elektroneneinfang geschaffenen Leerstellen wieder aufzufüllen. Dies gilt nicht für die kondensierte Phase. Hier muß man folglich zwei völlig getrennte Leerstellenkaskaden berücksichtigen; eine nach dem Elektroneneinfang von Iod-125 und die zweite nach innerer Konversion des metastabilen Tochternuklids Te-125.

Wegen der hohen Energiedichte der Auger-Radiolyse sollte man bei Radionukliden, die durch innere Konversion oder Elektroneneinfang zerfallen, ein gegenüber der "normalen" γ -Radiolyse verändertes Ionisierungs- und Radikalbildungsvermögen beobachten. Experimentell ist eine Unterscheidung zwischen beiden Anteilen nicht immer leicht. Dennoch konnten in der Vergangenheit in einer Reihe von Fällen, auch zunächst ungeklärte Beobachtungen, auf die Auswirkungen des Auger-Effektes zurückgeführt werden. Die im Vergleich zu Tritium wesentlich höhere Radiotoxizität von DNA-gebundenem Iod-125 (bezogen auf die gleiche absorbierte Dosis) wird heute allgemein auf den mit dem Iod-125-Zerfall verbundenen Auger-Effekt zurückgeführt (z. Übersicht s. [16,34]).

Halpern und Stöcklin [35] zeigten mit einer völlig anderen experimentellen Methode die drastischen Auswirkungen des Auger-Effektes. Sie bestrahlten festes Bromdesoxyuridin mit monoenergetischen Röntgenstrahlen im Bereich der K-Absorptionskante des Broms. Mit Hilfe quantitativer ESR-Spektroskopie ermittelten sie die Radikalausbeute pro absorbierter Doseinheit als Funktion der Photonenenergie (Abb. 7).

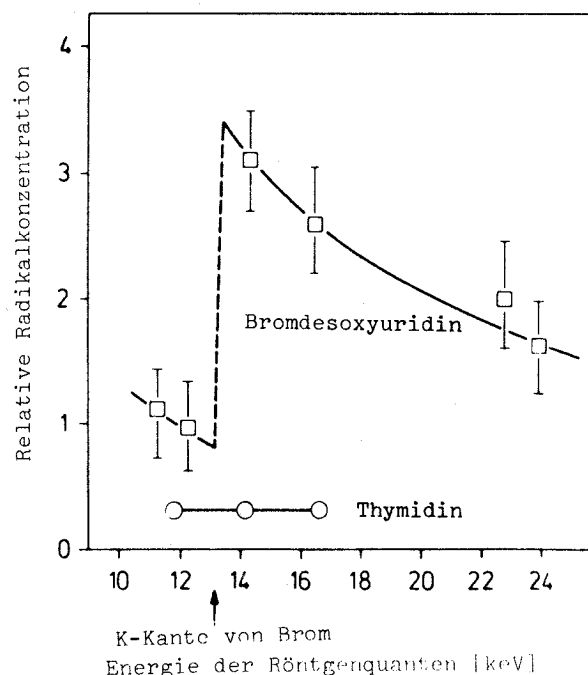


Abb. 7: Konzentration von freien Radikalen als Funktion der Energie der eingestrahlten Röntgenquanten [35].

An der K-Absorptionskante beobachteten sie einen Anstieg der Radikalkonzentration um einen Faktor 2 bis 3. Ähnliche Resonanzeffekte wurden auch bei der Inaktivierung von Metalloproteinen (Enzymen) beobachtet [36,37]. Zuletzt sei noch auf eine Arbeit von Deutzmann und Stöcklin [12] näher eingegangen, die als erste mit rein chemischen Methoden nachwiesen, daß ein qualitativer Unterschied besteht zwischen Schäden, die auf externe Radiolyse zurückzuführen sind und solchen, die durch Iod-125-Transmutation verursacht werden. Sie verglichen die Zerfallsprodukte von doppelt-(^{14}C und ^{125}I)-markiertem Ioduracil mit denen der einfach- ^{14}C -markierten aber Co-60- γ -bestrahlten Verbindung (Abb. 8).

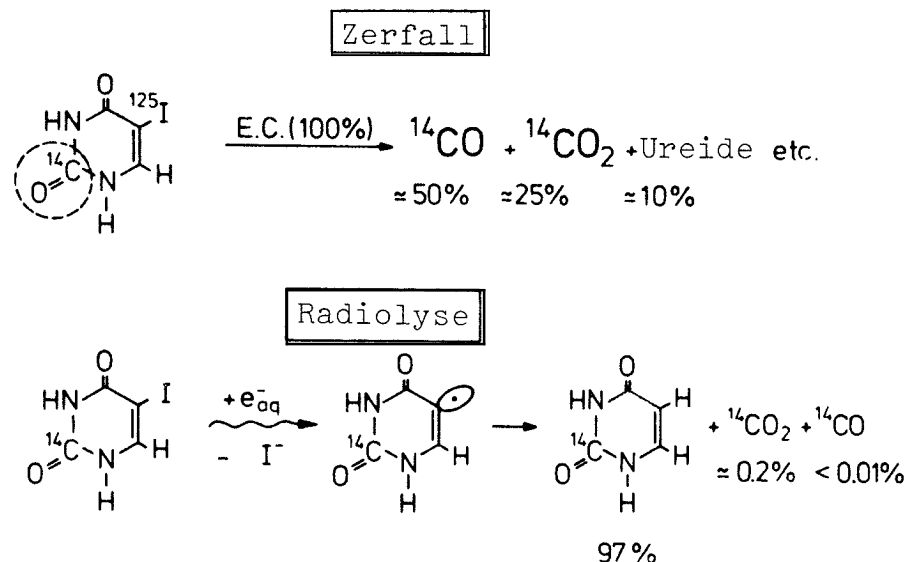


Abb. 8: Vergleich der Produktspektren nach Zerfall von Iod-125 in [2- ^{14}C , 5- ^{125}I]-Ioduracil und nach externer Radiolyse [12]

Während nach γ -Radiolyse hauptsächlich Uracil gefunden wurde, entstanden unter gleichen Bedingungen nach Zerfall von Iod-125 CO und CO_2 als Hauptprodukte. Diese Ergebnisse zeigen ganz offensichtlich, daß die Folgen des Auger-Effektes für die unmittelbare Umgebung viel drastischer sind als die Konsequenzen der externen Bestrahlung mit γ -Quanten.

2.2 Strahlenchemie des Wassers

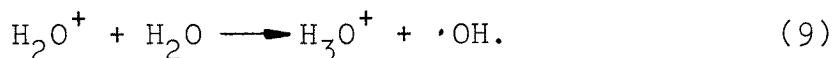
Dieses Kapitel soll einen kurzen Überblick über die wichtigsten Primärprozesse in der Radiolyse des Wassers vermitteln (für weitergehende Diskussionen vgl. z.B. [38]). Durch die Wechselwirkung energiereicher Strahlung mit Wasser entstehen ionisierte und angeregte Wassermoleküle.



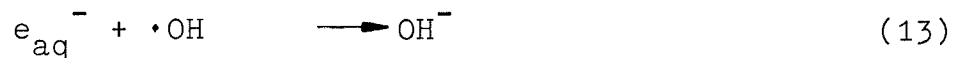
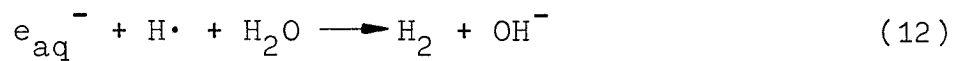
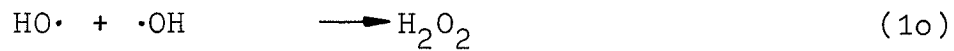
Die in Reaktion (6) gebildeten Elektronen können weitere ionisierte oder angeregte Spezies erzeugen. Deren Verteilung ist nicht homogen. Vielmehr bilden sich Zonen mit hohen Konzentrationen an reaktiven Wassermolekülen. Diese Bereiche nennt man Spuren ("spurs"). Die angeregten Wassermoleküle in den Spuren zerfallen unter Bildung von Wasserstoffatomen und OH-Radikalen



H_2O^+ -Ionen reagieren mit weiteren Wassermolekülen in einer Ionen-Molekülreaktion zu H_3O^+ -Ionen und OH-Radikalen



Die gebildeten reaktiven Spezies können eine Vielzahl von Kombinationsreaktionen eingehen, z.B.

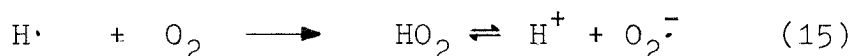
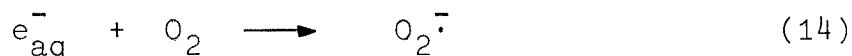


Die Anzahl der Moleküle, die pro 100 eV absorbiertener Energie gebildet wird, nennt man primäre Produktausbeute oder G-Wert. Sie hängt stark vom spezifischen Energieverlust der Strahlung (LET-Wert = Linear Energy Transfer) ab. Tab. 1 zeigt für Strahlung mit kleinem LET (z.B. γ -Quanten) die G-Werte der primären Radiolyseprodukte des Wassers.

Tab. 1: G-Werte der primären γ -Radiolyseprodukte des Wassers [38]

Radiolyseprodukt	G-Wert
$\text{HO}\cdot$	2.70
e_{aq}^-	2.65
$\text{H}\cdot$	0.55
H_2O_2	0.70
H_2	0.45

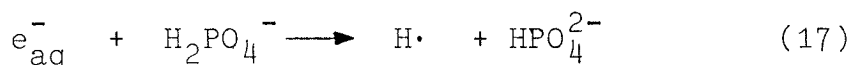
Durch Zusatz geeigneter Stoffe können die Primärradikale abgefangen oder konvertiert werden. Mit Sauerstoff z.B. reagieren solvatisierte Elektronen und Wasserstoffatome gemäß Gl. (14) und (15).



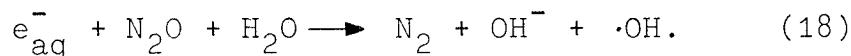
Die entstehenden Peroxyradikale verhalten sich gegenüber den meisten organischen Verbindungen inert. Unter Disproportionierung bilden sie H_2O_2 und Sauerstoff.



In Gegenwart von Phosphat-Ionen lassen sich solvatisierte Elektronen zu Wasserstoffatomen konvertieren,



mit N_2O entstehen OH-Radikale



Für eine Vielzahl solcher Einzelreaktionen der reaktiven Spezies $\text{H}\cdot$, $\cdot\text{OH}$ und e_{aq}^- wurden in den letzten Jahren Geschwindigkeitskonstanten bestimmt. Diese Größen können auch für eine erste Beurteilung des kinetischen Verhaltens von Mischsystemen, die mehrere konkurrierende Komponenten enthalten, herangezogen werden.

Im allgemeinen geht man davon aus, daß $\text{H}\cdot$ und $\cdot\text{OH}$ mit organischen Verbindungen unter Addition (an Doppelbindungen) oder H-Abstraktion reagieren. Solvatisierte Elektronen können als reaktives Nukleophil betrachtet werden, das mit geeigneten Akzeptor-Molekülen Radikal-Anionen bildet, die anschließend protoniert werden.

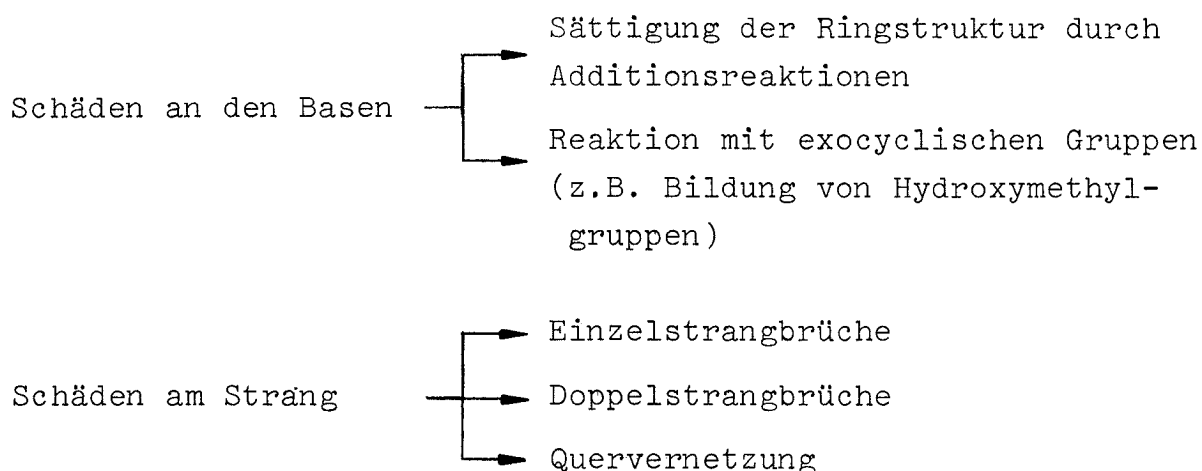
2.3. Strahlenschäden an Nukleinsäuren und ihren Komponenten

Die strahleninduzierten Radikale der Wasserradiolyse (s. Abschnitt 2.2.) reagieren rasch mit DNA oder DNA-Bausteinen. Tab. 2 zeigt einige Beispiele für Geschwindigkeitskonstanten solcher Reaktionen.

Tab. 2: Geschwindigkeitskonstanten für Reaktionen von Wasser-radikalen mit DNA und einigen ihrer Komponenten in neutraler Lösung [39]

Verbindung	$k \times 10^9 \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$		
	e_{aq}^-	OH	H
Thymin	17	5.3	0.2
Cytosin	13	6.8	0.1
Guanin	14	11	-
Adenin	9	5.8	0.1
2'-Desoxyribose	0.01	1.9	0.02
DNA	0.14	0.6	0.05

Bei den beobachteten Schäden lassen sich verschiedene Gruppen unterscheiden (für eine Übersicht s. z.B. [40]):



Die Basen (Abb. 9) unterscheiden sich in ihrer Strahlenempfindlichkeit. Sie nimmt in der Reihenfolge T>C>A>G ab. Das Ausmaß der Schädigung, ausgedrückt als G(-Base), hängt von verschiedenen Parametern ab, z.B. dem pH der Lösung, der Gegenwart von Salzen und der Art der Strahlung [41-43].

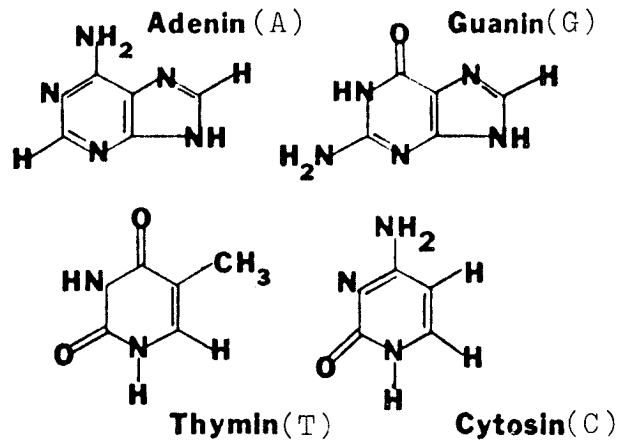
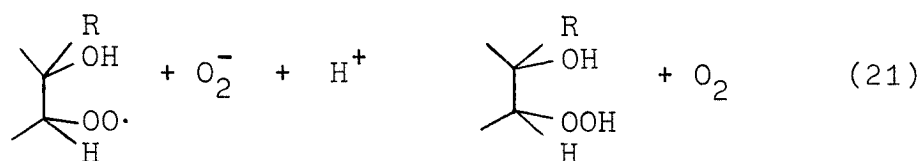
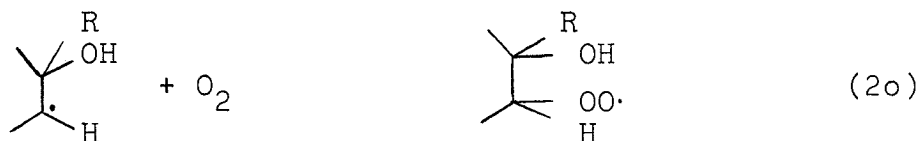
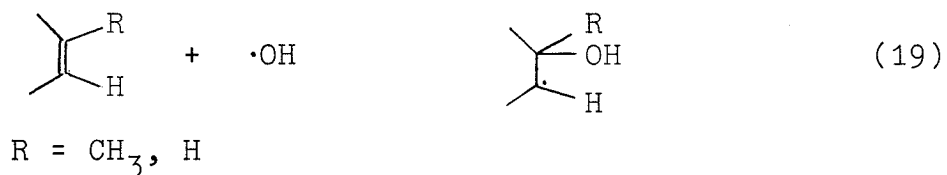


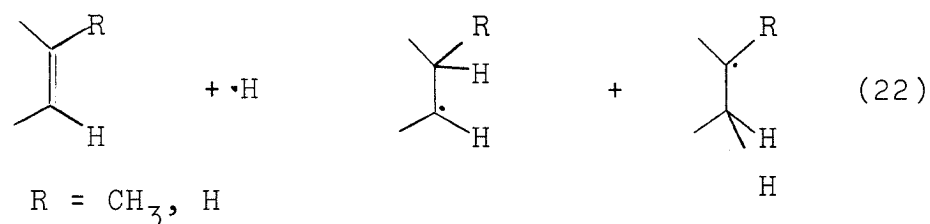
Abb. 9: Struktur der DNA-Basen

OH-Radikale greifen die Nukleinsäurebasen bevorzugt an den Doppelbindungen (5,6 bei Pyrimidinen und 7,8 bei Purinen) an [44-46]. Mit Thymin reagiert $\cdot\text{OH}$ dabei etwa gleich häufig an C-Atom 5 und 6. Bei Cytosin wurde fast ausschließlich C5-Addition beobachtet [47].

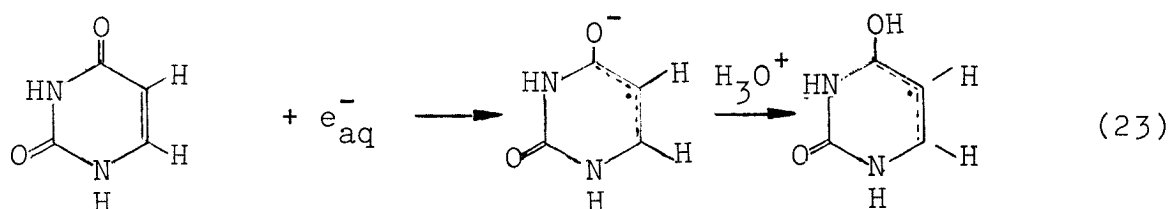


Die primären OH-Additionsprodukte von Thymin und Cytosin (Gl. 19) reagieren in Gegenwart von Sauerstoff entsprechend der Gl. (20) und (21) weiter zu Hydroxyhydroperoxiden [48,49].

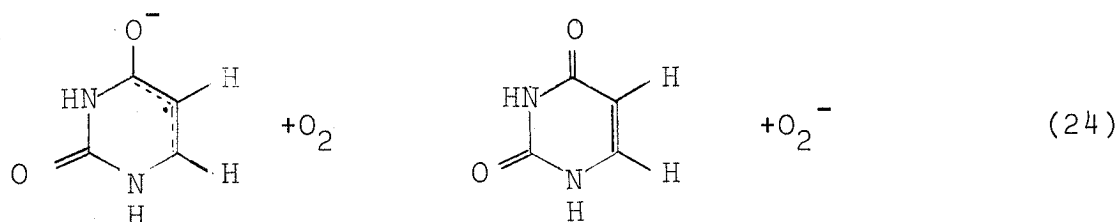
Reaktionen mit Wasserstoffatomen spielen in neutralen wässrigen Lösungen nur eine untergeordnete Rolle, weil die Radiolyseausbeute ($G = 0,55$) von atomarem Wasserstoff nur etwa 10 % der Gesamtausbeute an reaktiven Spezies ausmacht. In sauren Lösungen werden aber auch solvatisierte Elektronen ($G = 2,65$) in H-Atome umgewandelt (s. Gl. 17) und die Bildung von H-Additionsprodukten gewinnt an Bedeutung. H-Atome addieren wie OH-Radikale bevorzugt an die Doppelbindungen der Purin- und Pyrimidinbasen [50].



Die entstehenden Molekülradikale stabilisieren sich je nach Medium in Form der entsprechenden Dihydroverbindungen [51], als Hydroxide oder Hydroperoxide [52]. Die primären Reaktionsprodukte hydratisierter Elektronen lassen sich gut in sauerstofffreien Lösungen, die Alkohol als Fänger für H- und OH-Radikale enthalten, beobachten. Die Elektronen-Addukt-Spektren der Nukleinsäurebasen zeigen Unterschiede zu den entsprechenden H-Addukt-Spektren [53,54], was darauf hindeutet, daß die beiden reduzierenden Spezies an verschiedenen Stellen innerhalb der Basen angreifen. Mit Hilfe von ESR-gekoppelter Puls-Radiolyse gelang der Nachweis, daß im Fall von Uracil und Thymin der Angriff von e_{aq}^- an der Carbonylgruppe in Pos. C4 erfolgt [55].



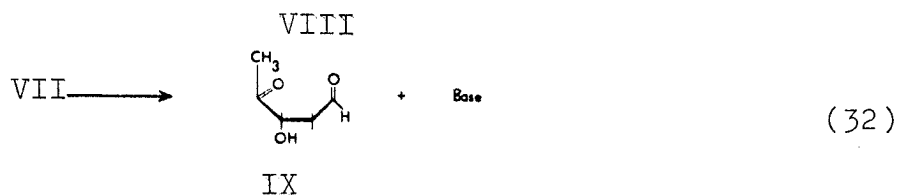
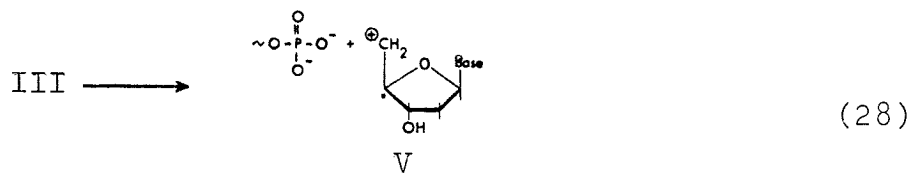
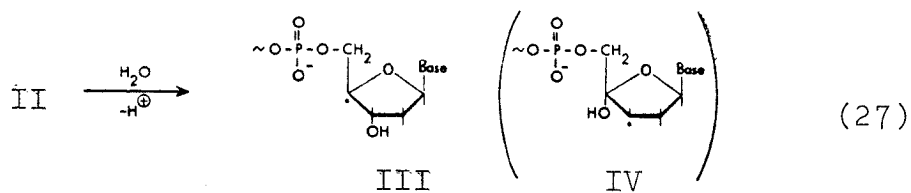
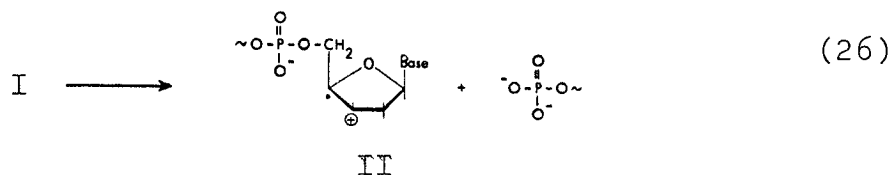
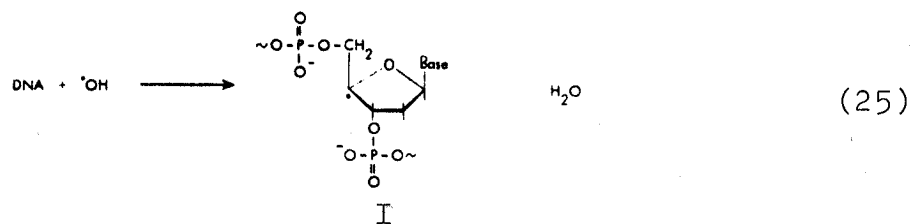
Die entstehenden Radikationen sind resonanzstabilisiert. In saurer Lösung werden sie rasch protoniert. In Gegenwart von Sauerstoff beobachtet man neben der Bildung von Peroxyradikalen auch Elektronenaustausch, der zur Rückbildung des Ausgangsprodukts führt.



Oder anders ausgedrückt: In sauerstoffhaltiger Lösung werden die Basen durch solvatisierte Elektronen nur wenig geschädigt [56].

Während die Schädigung der heterozyklischen Basen nicht notwendigerweise zu Strangbrüchen führt, wird nach Zerstörung des Zuckerrests die Nukleinsäurekette unterbrochen. Aus diesem Grund erschien es notwendig, die Strahlenchemie der Zuckerkomponente zu untersuchen, obwohl bereits seit langem bekannt war, daß von den Wasserradikalen praktisch nur das OH-Radikal am Zucker angreift und auch das nur in 10-20 % aller Fälle [48]. Besonders die Untersuchungen von Schulte-Frohlinde, von Sonntag und Mitarbeitern an einer Vielzahl von Zuckerderivaten und DNA-Modellsubstanzen haben hier viel zur Aufklärung beigetragen (z. Übersicht s. [57,58]).

Für die Spaltung der Phosphodiester-Bindung (= Einzelstrangbruch) als Folge strahleninduzierter Schädigung der Desoxyribose postulierten sie folgenden Reaktionsweg [57]:



Ein OH-Radikal abstrahiert zunächst ein H-Atom an C4'. Das führt zum Austritt des Phosphatesteranions an C3'. Damit ist die DNA-Kette schon gebrochen. Nach rascher Wassieranlagerung und Deprotonierung wird auch die zweite Phosphatestergruppe abgespalten. Das freigesetzte Nukleosid-Radikal addiert unter H⁺-Abspaltung ein weiteres Molekül Wasser und abstrahiert von einem geeigneten Donator ein H-Atom. Das entstehende Nukleosid geht unter Ringöffnung in ein Hemiaminal über, das in die unveränderte Base und ein Molekül Didesoxypentulose zerfällt.

OH-Radikale können außer an C4' auch an anderen Positionen innerhalb des Zuckers angreifen [59]. Es ist anzunehmen, daß auch H-Abstraktion von anderen C-Atomen zu Strangbrüchen führt. Dabei werden jedoch nicht notwendigerweise niedermolekulare Bausteine freigesetzt, so daß solche Schäden analytisch nicht leicht nachzuweisen sind.

DNA-Strangbrüche, die durch Spaltung von C-C-Bindungen entstehen, wurden bisher nur in sauerstoffhaltigen Lösungen beobachtet [60]. Sie gehen auf intermediäre Peroxylradikale zurück, die sich durch bimolekularen Zerfall und anschließende β -Fragmentation stabilisieren.

DNA-Doppelstrangbrüche gehen in den meisten Fällen auf ein Zwei-Treffer-Ereignis zurück, bei dem zwei Einzelstrangbrüche dicht benachbart auf gegenüberliegenden Strängen auftreten [61]. Die Häufigkeit solcher Brüche wächst linear mit dem Quadrat der Dosis. Einige Doppelstrangbrüche scheinen auf Ein-Treffer-Ereignisse zurückzugehen [62]. Dieser Anteil steigt wie die Zahl der Einzelstrangbrüche proportional zur Dosis.

Lett und Alexander [63] berichteten bereits 1961 über intra- und intermolekulare kovalente Quervernetzungen ("cross-links") in bestrahlter DNA. Dennoch ist diese Art Strahlenschaden bis heute molekular nur wenig untersucht. Es werden Verknüpfungen zwischen Histonproteinen und DNA-Strängen [64] diskutiert, sowie cyclische Verbindungen analog den Photodimeren [65]. Kürzlich beobachtete man Brücken über Iminogruppen, die da-

durch entstanden sein sollen, daß die Aminogruppe einer Base mit einer Carbonylgruppe eines benachbarten radiolysegeschädigten Zuckerrests reagiert [66].

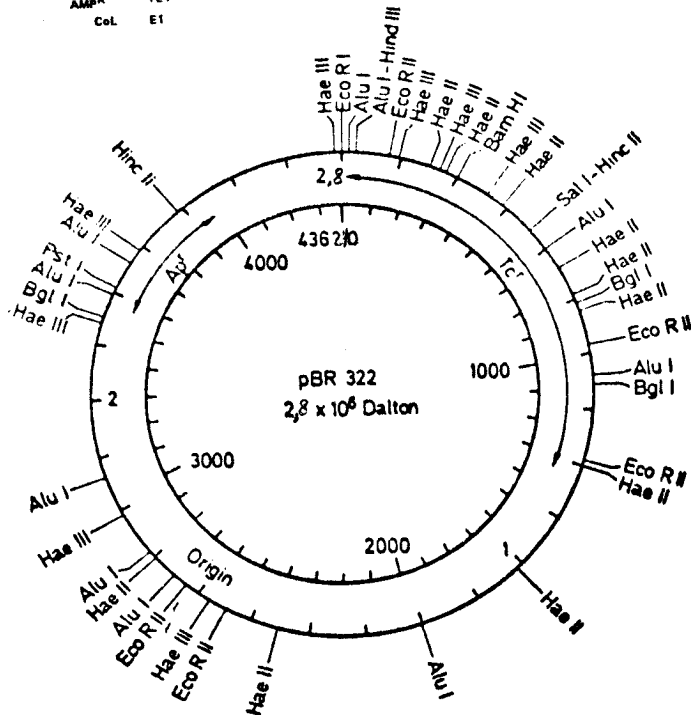
2.4. Das Plasmid pBR 322: Herkunft, Struktur und Bedeutung für Molekularbiologie

Plasmide sind extrachromosomale ringförmige DNA-Moleküle in Bakterienzellen mit der Fähigkeit sich autonom zu replizieren. Damit sind sie als Vektoren für DNA-Klonierungsexperimente prinzipiell geeignet. DNA-Klonierung ist eine Methode zum Anreichern einzelner DNA-Sequenzen. Vektoren dienen dabei als Träger, die für Transport und Vermehrung der gewünschten DNA-Fragmente ("Passagier"-DNA) sorgen.

Übertragungsrate und Replikation in der Wirtszelle sollten mit möglichst hoher Effizienz erfolgen. Da die natürlich vorkommenden Plasmide diesen Anforderungen nur bedingt genügen, konstruierte man künstliche Hybridplasmide [67,68]. Das augenblicklich meistbenutzte ist pBR 322 [69]. Abb. 10 zeigt "Stammbaum" und Restriktionskarte dieses Plasmids.

Für den Erfolg von pBR 322 als biologischen Vektor gibt es eine Reihe von Gründen. Mit einem Molekulargewicht von $2,8 \cdot 10^6$ d ist es ein relativ kleines Plasmid, das sich sehr gut handhaben läßt. Es kommt in mehreren Kopien pro Wirtszelle vor. Seine Replikation läßt sich von der des Wirtsgenoms abkoppeln. Es trägt Resistenzgene für die Antibiotika Ampicillin (amp^r) und Tetracyclin (tet^r) [69]. Die können als Indikatorgene dienen, um z.B. eine erfolgreiche Transformation nachzuweisen oder sie können durch Insertion von DNA-Fragmenten inaktiviert werden. Eine Reihe von Restriktionsendonukleasen (z.B. Eco RI, Hind III, Bam HI, Sal I, Ava I, Pst I) [69] schneidet das Plasmid jeweils nur an einer Stelle, wodurch sich eines der Resistenzgene inaktivieren läßt. Die gesamte Nukleotidsequenz ist bekannt [20]. Damit läßt sich hier für jedes Restriktionsfragment die genaue Größe und Lage inner-

AMP ^R	TET ^R
Col	E1



a) genetische Ableitung [7o]
b) Restriktionskarte [2o]

halb des Plasmids angeben. PBR 322-Fragmente können als exakt definierte Längenstandards dienen, um beliebige DNA-Abschnitte mit Größen bis 4362 Basenpaare zu vermessen. Die Genprodukte von pBR 322 sind untersucht [71,72] und letztlich entspricht es den Sicherheitsanforderungen an einen EK2-Vektor [73].

3. EXPERIMENTELLES

3.1. Radiochemikalien und Reagenzien

- Na¹²⁵I, ohne Trägerzusatz und frei von Reduktionsmittel in verdünnter NaOH-Lösung (spezif. Akt. $\sim$ 2000 Ci/mmol; Konz. > 500 mCi/ml) Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig und Fa. New England Nuclear, Boston
- [U-¹⁴C]-2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP); in wässriger Lösung mit 2 % Ethanol-Zusatz (spezif. Aktivität: 300 - 500 mCi/mmol); Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig
- Iodorotsäure, 2-Desoxyribose(-5-phosphat), Isobarbitursäure, Dihydrouracil, Alloxan, Parabansäure, 5-Aminouracil, Ioduracil, Iodecytosin, Ioddesoxyuridin, Ioddesoxycytidin, Ioddesoxyuridinmonophosphat, Ioddesoxycytidinmonophosphat; Fa. Sigma, München
- Ethidiumbromid, Xylencyanol, Thiamin, Chloramphenicol, Natriumdodecylsulfat, 2-Mercaptoethanol, Polyethylenglykol 20 000, Agarose, Visking Dialyseschlauch, Pepton aus Casein, Cytochrom c, Uranylacetat, Silikonlösung, Triton-X-100; Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Hydroxylapatit Biogel HTP, Desalting Biogel P6-DG; Fa. Bio Rad, München

- Cytosin, Uracil, Desoxynukleoside, Desoxynukleosid-mono-, -di- und -triphosphate, Dithiothreitol, Phosphoenolpyruvat, Rinderserumalbumin (BSA); Fa. Boehringer, Mannheim
- Thallium(III)-acetat; Fa. Riedel de Haën, Seelze
- Sephadex G 50; Fa. Deutsche Pharmacia, Freiburg
- Instagel Szintillator Cocktail; Fa. Packard Instruments, Frankfurt
- alle anderen Chemikalien; Fa. Merck, Darmstadt

3.2. Enzyme und Nukleinsäuren

- Proteinase K aus Tritirachium album; Ribonuklease (RNase) A aus Rinderpankreas; Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Trypsin aus Rinderpankreas; Lysozym aus Hühnereiweiß; DNA-Polymerase I aus E.coli, Endonuklease-frei; Desoxyribonuklease (DNase) I aus Rinderpankreas; Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III; T⁴-DNA-Ligase; Nuklease S1 t-RNA; λ-DNA; PM2-DNA; Fa. Boehringer, Mannheim

3.3. Standardisierte Medien

- M9-Puffer: 3g KH₂PO₄, 7 g Na₂HPO₄·2H₂O, 1 g NH₄Cl, 0,5 g NaCl, H₂O ad 1000 ml (Stammlsg.: 10-fach konzentriert)
- M9 (Nährmedium f. Bakterien): 0,4 % Glucose, 1 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, M9-Puffer [74]
- TE (Dialysepuffer): 10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) 1 mM EDTA mit HCl auf pH 8,1 eingestellt (Stammlsg. 100-fach konzentriert)

- EP (Elektrophoreseepuffer): 40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
pH 8,1 (Stammlsg.: 50-fach konzentriert)
 - RP (Reaktionspuffer) für Enzymreaktionen:
 - RP-Sal I: 0,15 M NaCl, 6 mM MgCl₂, 6 mM Dithiothreitol
(DTT) 6 mM Tris-HCl pH 7,9
 - RP-DNA-Pol I: 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM Kaliumphosphat-
puffer pH 7,2
 - RP-DNA-Ligase: 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,6 mM ATP, 20 mM
Tris-HCl pH 7,6
 - RP-DNase I: 4 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,2
 - RP-Nuclease S1: 30 mM Natriumacetat, 0,1 mM Zn SO₄, pH 4,5
- (Stammlösungen jeweils 10-fach konzentriert)

3.4. Geräte

- Ultrazentrifugen: Christ Omega 70 000; Beckman L2;
Sorvall RC-5B
- Spektralphotometer: Zeiss PMQ II; Beckman UV 5270
ISCO UA5
- Elektrophoresekammer: Bio Rad Modell 221 mit Netzgerät
Heinzinger HN 5000-01
- Gaschromatograph: Intersmat IGC 16
- Hochdruckflüssigkeitschromatographen: a) Eigenbau mit Pumpe
Orlita DMP-AE 10.4, Pulsationsdämpfer Orlita PDM 3350,
Manometer Wika 82.2, Probenaufgabeeventil Latek 7125,
UV-Absorptionsdetektor Waters 440 und Fraktionssammler
ISCO 328; b) Spectra Physics SP 8000 B

- Szintillationsspektrometer: Packard Tricarb 3375, Autogamma 5375 und 5210
- Gefrierätzanlage: Balzers
- Elektronenmikroskop: Philips EM 300
- Elektronisches Längenmeßgerät: Hewlett Packard Digitizer 9874 A mit Tischrechner HP 9825

3.5. Bakterienzucht und Plasmidvermehrung

Die Wildtypform des Plasmids pBR 322 wurde in E.coli K12 Stamm 461 (von Dr. Kemper, Uni Köln freundlicherweise zur Verfügung gestellt) vermehrt (modifiziert nach [74]). Einzelkolonien von Tetracyclin-haltigen Agarplatten wurden zum Animpfen von 10 ml M9-Kulturen benutzt, die mit Casaminsäuren (CAA, 0,4 %) und Vit B1 (2 µg/ml) angereichert waren und ebenfalls Tetracyclin (20 µg/ml) enthielten (M9' + tet). Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden diese Kulturen zum Animpfen von jeweils 1 l M9'+tet-Medium verwendet. Im allgemeinen wurde mit 6 1l-Kulturen oder einem 10 l-Fermenteransatz gearbeitet. Diese Kulturen wurden ebenfalls bei 37°C gehalten. Sobald sie eine Zelldichte von etwa $2-3 \times 10^8$ Zellen/ml erreicht hatten, erkennbar an einer optischen Dichte von 0,6 bei 650 nm, wurde festes Chloramphenicol bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt [75]. Danach wurde weitere 20 h inkubiert.

3.6. Plasmidisolierung

Die Zellsuspension wurde bei 4°C 15 min niedertourig zentrifugiert. Das Pellet von jeweils 1 l Kultur wurde in 4 ml 0,25 M Sucrose, 2 mM MgCl₂ aufgenommen. Nach der Methode von Clewell und Helinski [75] wurde daraus ein geklärtes Lysat hergestellt. Im Einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

0,8 ml einer Lösung von Lysozym (20 mg/ml) in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8 wurden zu dem resuspendierten Pellet gegeben. Die Lösung wurde dann, wie auch während aller weiteren Schritte bei 0°C inkubiert. Nach 5 min wurden 1,2 ml 0,2 M EDTA-Lsg. pH 8,0 zugefügt; nach weiteren 5 min 6,5 ml einer Mischung aus 0,5 % (w/v) Triton-X-100, und 0,06 M EDTA in 50 mM Tris-HCl pH 8,0. Dieses Lysat wurde unter gelegentlichem vorsichtigen Schütteln noch 20 min im Eis aufbewahrt. Bis zur Reinigung über Hydroxylapatit konnte es in dieser Form problemlos bei -20°C gelagert werden.

3.7. Plasmidreinigung

Das Plasmid wurde über Hydroxylapatitchromatographie gereinigt; eine Methode, die Britten und Mitarbeiter [76] erstmals 1970 beschrieben, die inzwischen aber schon mehrfach modifiziert wurde.

Hydroxylapatitpulver wurde in 8 M Harnstoff, 0,24 M Natriumphosphatpuffer pH 6,8 aufgeschlemmt und in eine weite Glas-säule (oder eine 50 ml Einmalspritze) überführt. Um das Lysat von 1 l Zellkultur zu reinigen, genügten 2 g des Adsorbens. 1,1 Vol.-Teile geklärtes Lysat wurden mit 8,9 Vol.-Teilen 9 M Harnstoff, 0,27 M Phosphatpuffer, 0,9 % Natriumdodecylsulfat (SDS) pH 6,8 gemischt und auf die Säule geladen. Nachdem die DNA-Mischung durch die Säule gelaufen war, wurde mit 8 M Harnstoff, 0,24 M Phosphatpuffer pH 6,8 solange nachgewaschen, bis das Eluat bei 260 nm keine merkliche Absorption mehr zeigte. Mit 2 Säulenvolumen verdünntem Phosphatpuffer (10 mM) wurde die Säule zwischengespült. Mit noch einmal der gleichen Menge Puffer wurde das Säulenmaterial resuspendiert und nach erneutem Absitzen nachgewaschen. Zugabe von 0,3 M Phosphatpuffer führte schließlich zur Freisetzung der Plasmid-DNA. Das Eluat wurde gegen TE-Puffer dialysiert und in Einzelfällen mit Ethanol umgefällt. DNA-Konzentration und Verunreinigung mit Protein wurden aus der Extinktion bei 260 nm ($1 E_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$) bzw. dem Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm ermittelt. Letzteres lag stets über

1,95, d.h. die DNA konnte praktisch protein-frei gewonnen werden. Elektrophorese und Elektronenmikroskopie zeigten weiterhin, daß die Hauptmenge der Plasmid-DNA als Komponente I ("supertwisted") vorlag und daß das Material frei von chromosomaler DNA war.

3.8. Enzymreaktionen

3.8.1. Spaltung mit Sal I Restriktionsendonuklease

In einem Gesamtvolumen von 1 ml wurden bis zu 200 µg DNA mit der entsprechenden Menge Enzym (1,5 u Enzym pro µg DNA) und 100 µl 10-fach konzentriertem Reaktionspuffer (Zusammensetzung s. u. 3.3.) über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 0,2 M EDTA ($c_f = 20$ mM) wurde die Reaktion gestoppt. Mit 2,5 M Ammoniumacetat wurde die DNA-Lösung auf eine Konzentration von 0,2 mol/l gebracht, bevor die Proteine mit Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) extrahiert wurden. Um die DNA auszufällen, wurde die wässrige DNA-Phase mit dem 25-fachen Volumen eiskalten Ethanol versetzt, mehrere Stunden bei -20°C aufbewahrt und dann 45 min bei 49000 x g (SS34, 20 000 rpm) zentrifugiert.

3.8.2. DNA-Polymerase Reaktion

pBR 322 DNA aus der Sal I-Reaktion (3.8.1.) wurde in DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (s. 3.3.) aufgenommen. Inaktive Desoxynukleosid-5'-triphosphate wurden jeweils bis zu einer Endkonzentration von 20 µM zugesetzt. Die Konzentration von radioaktiv markiertem IdCTP lag bei 2 µM. Pro aktivem Ansatz wurde 1 mg DNA in 10 ml Reaktionsvolumen eingesetzt und mit 1000 u DNA-Polymerase I bei 10°C inkubiert. Die Reaktionszeit betrug 7 h. Beendigung der Reaktion, Proteinextraktion und DNA-Fällung erfolgten analog der unter 3.8.1. beschriebenen Sal I-Reaktion mit folgender Ausnahme:

Die Reaktionslösung der doppeltmarkierten DNA wurde zunächst auf eine Säule (8x2,5 cm) mit Entsalzungsgel (Biogel P6-DG)

aufgetragen, um die markierte DNA von der Hauptmenge des überschüssigen IdCTP zu trennen (Abb. 11). Danach erst wurde die DNA von Protein befreit und mit Ethanol gefällt. Die Fällung wurde beschleunigt, indem das Ethanolgemisch 30' bei -78°C gehalten wurde. Dadurch konnte die radiolytische Schädigung der DNA durch nicht-eingebautes (notwendigerweise) überschüssiges IdCTP so gering wie möglich gehalten werden (Dosisleistung in doppeltmarkiertem Polymerase-Ansatz: 160 rad/h). Die Fällung wurde noch zweimal wiederholt. Danach war die Aktivität im Überstand praktisch auf Nullniveau heruntergegangen. Das Sediment wurde im Vakuum getrocknet. Alle niedermolekularen Verunreinigungen, wie nicht eingebautes Ausgangsmaterial, eventuelle Radiolyseprodukte, Pufferbestandteile etc. wurden durch diese Maßnahmen entfernt.

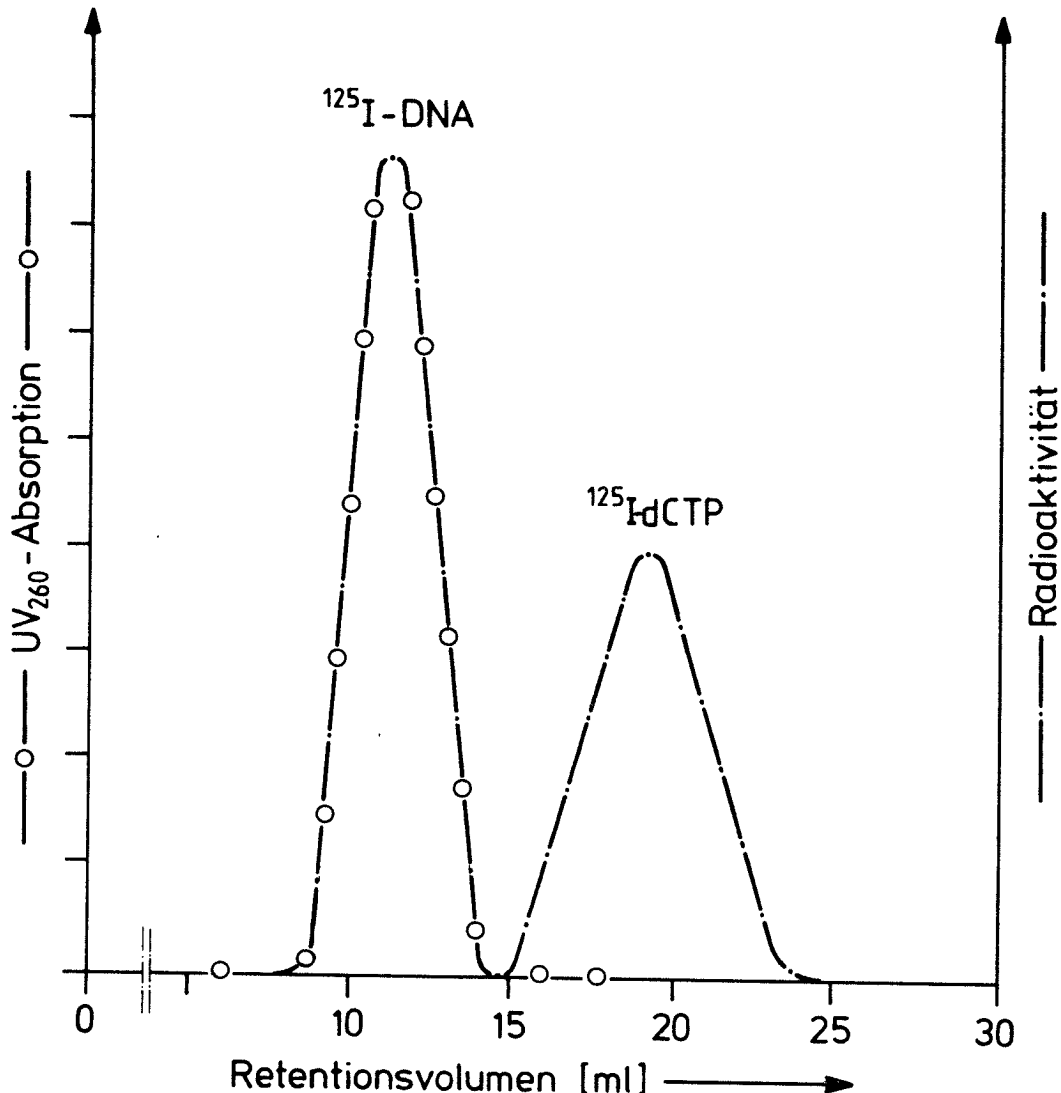


Abb. 11: Trennung von nicht-eingebautem ^{125}I IdCTP und markierter DNA auf einem Entsalzungsgel. (Biogel P6-DG), Eluens: TE, Strömungsgeschwindigkeit: 1,2 ml/min
— o — : UV₂₆₀-Absorption, — • — : Radioaktivität

3.8.3. DNA-Ligase-Reaktion

Um lineare DNA mit geraden Enden zu ligieren, wurde DNA aus der DNA-Polymerase-Reaktion (s. 3.8.2.) mit T⁴-DNA-Ligase umgesetzt (Pufferzusammensetzung s. u. 3.3.). Pro µg DNA wurde 1 Einheit (u) des Enzyms verwendet. Die DNA-Konzentration betrug 100 µg/ml; die Reaktionszeit 5 h bei Raumtemperatur. Die Proteine wurden wie unter 3.8.1. beschrieben abgetrennt und die DNA noch zweimal mit Ethanol gefällt (Kühlung bei - 78°C) und zum Schluß im Vakuum getrocknet.

3.8.4. DNA-Hydrolyse mit DNase und Nuclease S1

Etwa 10 µg DNA wurden in 100 µl DNase-Reaktionspuffer aufgenommen und mit 20 u DNase I über Nacht bei 37°C inkubiert [77]. Danach wurden 200 µl 30 mM Natriumacetatpuffer pH 4,5, 3 µl 10 mM Zn SO₄ und 10 u Nuklease S1 zugeführt und weitere 6 h bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden hitzedenaturiert und durch Zentrifugation abgetrennt. Die Nukleotide im Überstand wurden chromatographisch getrennt (RP 18,7 µ, 50 x 0,5 cm, 0,15 M Ammoniumphosphatpuffer pH 3,2).

3.9. Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung und Analyse von DNA erfolgte auf 1,2 %-igen Agarosegelen (30x12x0,3 cm). Die Agarose wurde zunächst 2 %ig angesetzt und durch 10-minütiges Kochen gelöst. 8 ml dieses Ansatzes wurden als unterer Abschluß zwischen die Glasplatten gegossen. Darüber kam nach vorheriger Verdünnung der Rest als 1,2 %iges Gel. Die Elektrophorese erfolgte im allgemeinen bei 75 Volt über Nacht unter Wasserkühlung. Die Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers ist unter 3.3. beschrieben. Nach Beendigung der Trennung wurden die Gele in 1 l Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) 30 min gefärbt und anschließend unter UV-Licht photographiert.

3.10. Synthese und Reinigung von einfach- und doppeltmarkiertem 5-Iod-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat (IdCTP)

Die Synthese von [U- ^{14}C , 5- ^{125}I]-IdCTP erfolgte durch Iodierung von ^{14}C -markiertem Desoxycytidintriphosphat (dCTP) mit Na^{125}I in Gegenwart von Tl(III) -Acetat als Oxidationsmittel [78].

Die Methode stellt eine Modifikation einer von Commerford beschriebenen Reaktion zur Iodierung von Nukleinsäuren [15] dar.

Zunächst wurde das ^{14}C -markierte dCTP in 2 Stufen durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie von störenden Verunreinigungen gesäubert. Zur Vorreinigung wurde eine 25x0,4 cm Säule mit Phasenumkehr-Material (RP 18, 7 μ) verwendet. Als Eluens diente destilliertes Wasser. Die Hauptreinigung erfolgte über eine Anionenaustauscher-Säule (20x0,4 cm, Aminex A25, 17, 5 μ) mit 2 verschiedenen konzentrierten Ammoniumcarbonat-Lösungen (0,25 M, 0,4 M) [79]. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum bei 35°C wurden 31 μCi (1,1 MBq) des gereinigten [U- ^{14}C]-dCTP (~ 90 nmol) in 400 μl Acetatpuffer pH 3,8 (0,3 M Essigsäure, 50 mM Natriumacetat) gelöst. Dazu wurden bei Raumtemperatur 95 mCi (3,5 GBq) Na^{125}I (in max. 150 μl) und 100 μl Tl(III) -Acetat (1 mg/ml Acetat-Puffer) gegeben. Das Ganze wurde in einem dicht verschlossenen Reacti-Vial 90 min auf 60°C erhitzt. Durch Zugabe von 20 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (10 mg/ml) wurde die Reaktion gestoppt. Die gesamte Reaktionslösung wurde auf eine HPLC-Säule (25x0,4 cm; RP 18, 7 μ) injiziert und mit 50 mM Ammoniumphosphatpuffer pH 3,2 eluiert (Abb. 12).

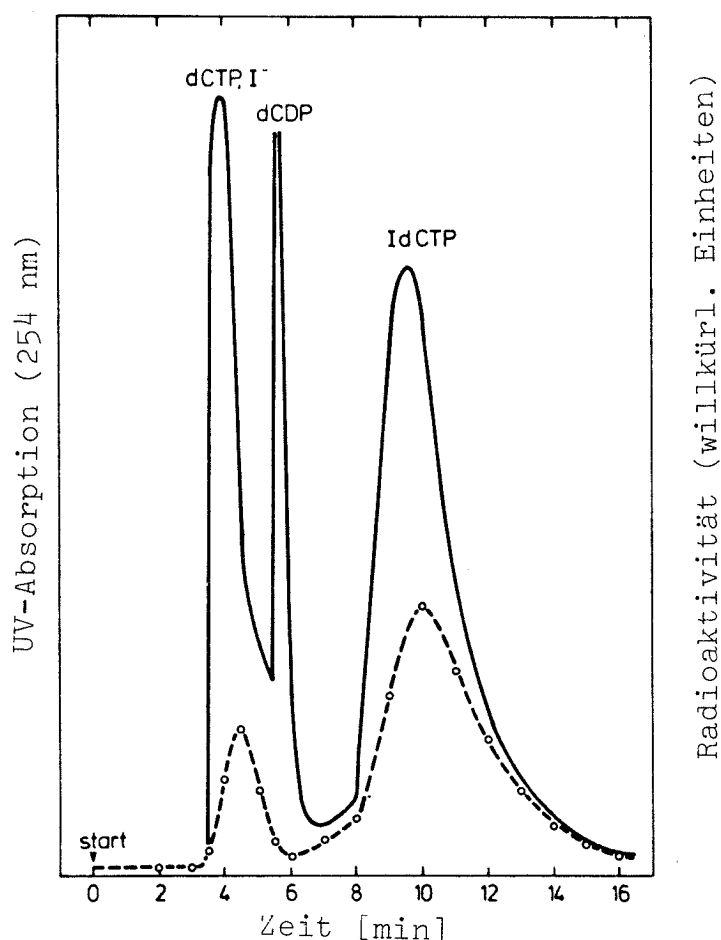


Abb. 12: Chromatogramm der Reaktionslösung auf RP 18 mit
50 mM Phosphatpuffer pH 3,2
Strömungsgeschwindigkeit: 1,2 ml/min
durchgezogene Linie: UV₂₅₄-Absorption
gestrichelte Linie: Radioaktivität

Aliquots der Eluat-Fractionen wurden in einem Szintillations-spektrometer gemessen. Das Lösungsmittel der IdCTP-Fraktion wurde im Vakuum bei Raumtemperatur abgezogen. Zurückgebliebenes Ammoniumphosphat wurde in einem zweiten Chromatographie-schritt über eine mit destilliertem Wasser betriebene RP 18-Säule (25x0,4 cm) vom IdCTP getrennt. Gesamtausbeute nach Synthese und Reinigung: 70-80 %.

Die Synthese von einfach- ^{14}C -markiertem IdCTP verlief analog. Nur wurden für die Iodierung von 35 μCi $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-dCTP}$ ($\sim 100 \text{ nmol}$) 54 nmol inaktives NaI (180 μl 0,3 mM) eingesetzt.

3.11. Reinheitsanforderungen

Bei allen Arbeitsgängen wurde darauf geachtet, daß die verwendeten Materialien kontaminationsfrei waren. Geräte und Reagenzien wurden soweit möglich vor Gebrauch sterilisiert. Ampullen, die zur Aufbewahrung der fertigen Proben dienten, wurden mit Chromschwefelsäure gereinigt, gründlich (im Ultraschallbad) mit destilliertem und dreifach-destilliertem Wasser gespült und bei 170°C getrocknet.

3.12. Probenaufteilung und -Aufbewahrung

Alle Proben wurden sofort nach DNA-Polymerase- bzw. Ligase-reaktion angesetzt. Doppeltmarkierte DNA wurde mit 10 mM NaCl bzw. Kaliumphosphat-Puffer pH 7 auf eine Iod-125-Aktivität von etwa 400 $\mu\text{Ci/ml}$ eingestellt. Jeweils 40 μCi DNA ($\sim 10 \text{ pmol}$) wurden in Brechsigelampullen überführt und dort mit weiterem Lösungsmittel 3 - 30-fach verdünnt. An einer Vakuumapparatur wurden die Ampullen dann mehrmals abwechselnd evakuiert und mit Sauerstoff (99,998 %) oder Stickstoff (99,9995 %) begast, um die Lösungen zu sättigen. Unter Kühlung mit Eiswasser wurden sie zugeschmolzen. Gelagert wurden sie 4-6 Monate im Dunkeln bei 4°C .

Für vergleichende Radiolyseexperimente wurden jeweils etwa 10 nCi ^{14}C -IdC-markierte DNA (= 15 pmol DNA) eingesetzt. Zu den fertigen Verdünnungen wurden jeweils 30 μCi Na^{125}I als interne Strahlenquelle hinzugegeben. Ansonsten waren Lagerungsbedingungen und -dauer identisch mit denen der doppeltmarkierten Proben.

3.13. Probenaufarbeitung

3.13.1. Gaschromatographische Trennungen

Die Brechsiegelampullen wurden an einer Vakuumapparatur auf 0°C vorgekühlt (Eiswasser), mit einem Eisenkern geöffnet und mit 1,5 ml (N.B.) $\text{CO}/\text{CO}_2/\text{C}_2\text{H}_6$ (1:1:1) als Trägergemisch viermal getöplert. Danach wurde die Gasphase quantitativ in eine Falle (12 bzw. 18 ml) überführt. Der größte Teil der Proben wurde etwas modifiziert aufgearbeitet (Abb. 13), um den in der flüssigen Phase gelösten Anteil CO_2 quantitativ auszutreiben.

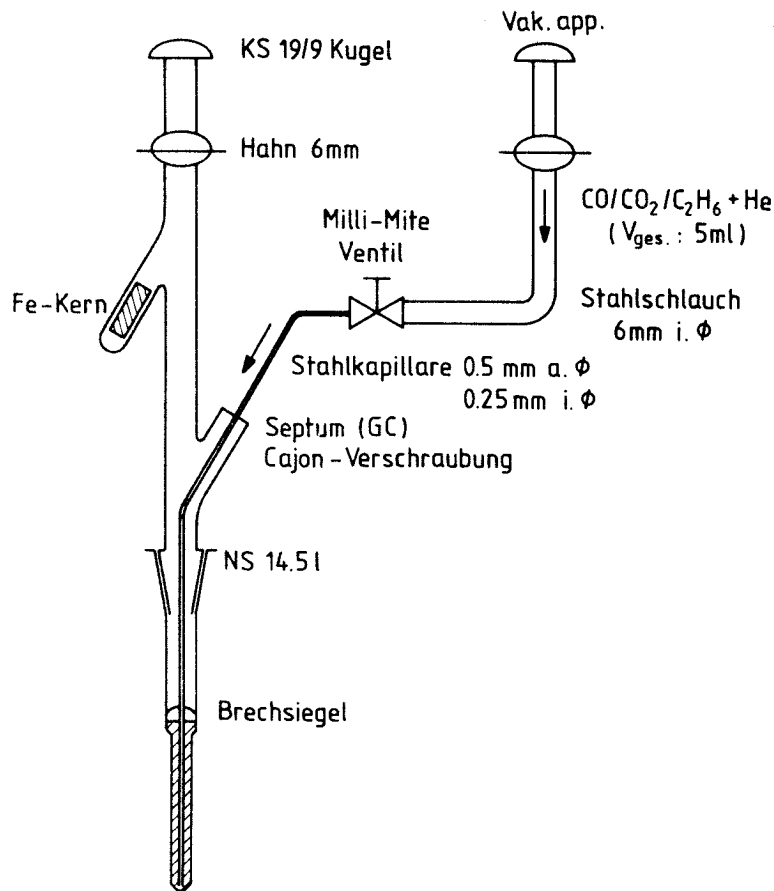


Abb. 13: Versuchsanordnung zum Abtöplern von ^{14}C -markierten Gasen

Hierzu wurde eine Stahlkapillare bis zum Ampullenboden geführt. Das Trägergasgemisch wurde mit 4 ml He langsam (15 min) durch die Lösung geleitet und dann, wie schon zuvor in eine Gasfalle getöplert. Die Falle wurde an einen Gaschromatographen angeschlossen. Die Trennung erfolgte über eine Porapak S (40/80 mesh) Säule (VA, 300 x 0,4 cm) unter folgenden Bedingungen: Temperatur des Einspritzblocks 180°C , Trägergas: He, Strömungsgeschw.: 50 ml/min, Temperaturprogramm: Start bei 30°C , nach 6 min mit $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf 190°C . Unter diesen Bedingungen wurden

folgende Bruttoretentionszeiten gemessen: CO: 0,9 min, CO₂: 4,5 min, C₂H₄: 7,6 min, C₂H₂: 8,2 min, C₂H₆: 9,3 min und H₂O: 14,2 min.

Am Ausgang des Gaschromatographen befand sich außer einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor ein auf 100°C geheiztes Gasproportionaldurchflußzählrohr (10 ml Volumen, 100 mV, Zählgas: 50 ml CH₄/min + 50 ml He, Zählgasbeute bei 100 ml/min Gesamtströmungsgeschw. 10 %). An dessen Ausgang wurden ¹⁴C-markierte Produkte in Pyrex-Fallen gesammelt und anschließend an einer Vakuumapparatur in statische Gasproportionalzählrohre überführt und gemessen.

3.13.2. Flüssigkeitschromatographische Trennungen

Nach Abtrennung der flüchtigen Produkte wurde die flüssige Phase mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt, um DNA und hochmolekulare DNA-Fragmente auszufällen (vgl. 3.8.1.). Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit den niedermolekularen Komponenten für hochdruckflüssigkeitschromatographische Trennungen weiter verwendet. Wie Tabelle 3 zeigt, wurde eine breite Palette von Pyrimidinderivaten und Ringfragmenten getrennt, in der Hoffnung, damit möglichst viele Zerfalls- und Radiolyseprodukte identifizieren zu können.

Trennungen wurden auf drei verschiedenen Säulentypen durchgeführt. Chromatographie über eine Säule mit dem Anionenaustauscherharz Aminex A25 (30 x 0,4 cm) und einem ethanolischen Natriumacetatpuffer (Natriumacetat:Essigsäure = 2:1; Wasser:Ethanol = 65:35) als Eluens hatte sich schon früher zur Trennung komplexer Gemische bewährt [80]. Abb. 14 zeigt ein Beispiel für eine Testtrennung. Der Verlauf der UV-Absorption wurde je nach Verbindungstyp bei 220, 234 und/oder 254 nm verfolgt. Nicht eingezeichnet wurden Verbindungen mit kürzeren Retentionszeiten als Uracil (s. Tab. 2 "VL"). I₂ und I⁻ blieben auf der Säule haften, was für die Analyse der doppeltmarkierten Proben von Vorteil war, weil eine Störung der ¹⁴C-Aktivitätsmessung durch die ¹²⁵I-Aktivität dieser beiden Substanzen vermieden wurde.

Tab. 3: Referenzsubstanzen für flüssigkeitschromatographische Trennungen (HPLC) und die dazugehörigen Retentionsvolumina auf verschiedenen Säulensystemen

Referenzsubstanz	Retentionsvolumina [ml]		
	A25 ^{a)}	RP18 ^{b)}	A6 ^{c)}
Formamid (FA)	VL	5,4	4,5
Formylharnstoff (FHS)	VL	9,3	6,5
Harnstoff (HS)	VL	5,4	4,5 ⁺
Desoxyribose (dR)	VL	6,4	VL
Alloxan (AX)	7,4	5,5	4,5
Isobarbitursäure (IBS)	4,4	8,4	7,5
Parabansäure (PS)	2,4*	9,6	7,8
Isodialursäure (IDS)	VL	7,7	4,5
Uracil (U)	3,0	11,3	8,7
Aminouracil (AU)	VL	5,5	kommt n. ⁺ v. Säule
Dihydrouracil (DHU)	VL	9,5	6,0
Ioduracil (IU)	20	39	31
Cytosin (C)	VL	7,4	7,5 ⁺
Iodcytosin (IC)	14,5	24	n.b.
Desoxyuridin (dU)	VL	22	n.b.
Ioddesoxyuridin (IdU)	4,8	220	16 ⁺
Desoxycytidin (dC)	VL	13	6,0 ⁺
Ioddesoxycytidin (IdC)	3,6	160	n.b.
Desoxyuridinmonophosphat (dUMP)	7,8*	16	n.b.
Iod-dUMP (IdUMP)	11,5*	65	n.b.
Desoxycytidinmonophosphat (dCMP)	6,0*	12,5	n.b.
Iod-dCMP (IdCMP)	9,8*	45	n.b.
Natriumiodid	kommt n.* v. Säule	VL	VL

a) 30 x 0,4 cm; 17,5 µ; 0,1 M Na-Acetat-Puffer (H₂O:EtOH=65:35)

* Retentionsvolumina beziehen sich auf 1 M Na-Acetat-Puffer

b) 50 x 0,4 cm; 7 µ; 0,15 M Ammoniumphosphat pH 3

c) 30 x 0,4 cm; 17,5 µ; 0,015 M Ammoniumphosphat pH 3

+ Retentionsvolumina beziehen sich auf 0,15 M Ammoniumphosphat pH 3

(VL = Vorlauf; n.b. = nicht bestimmt)

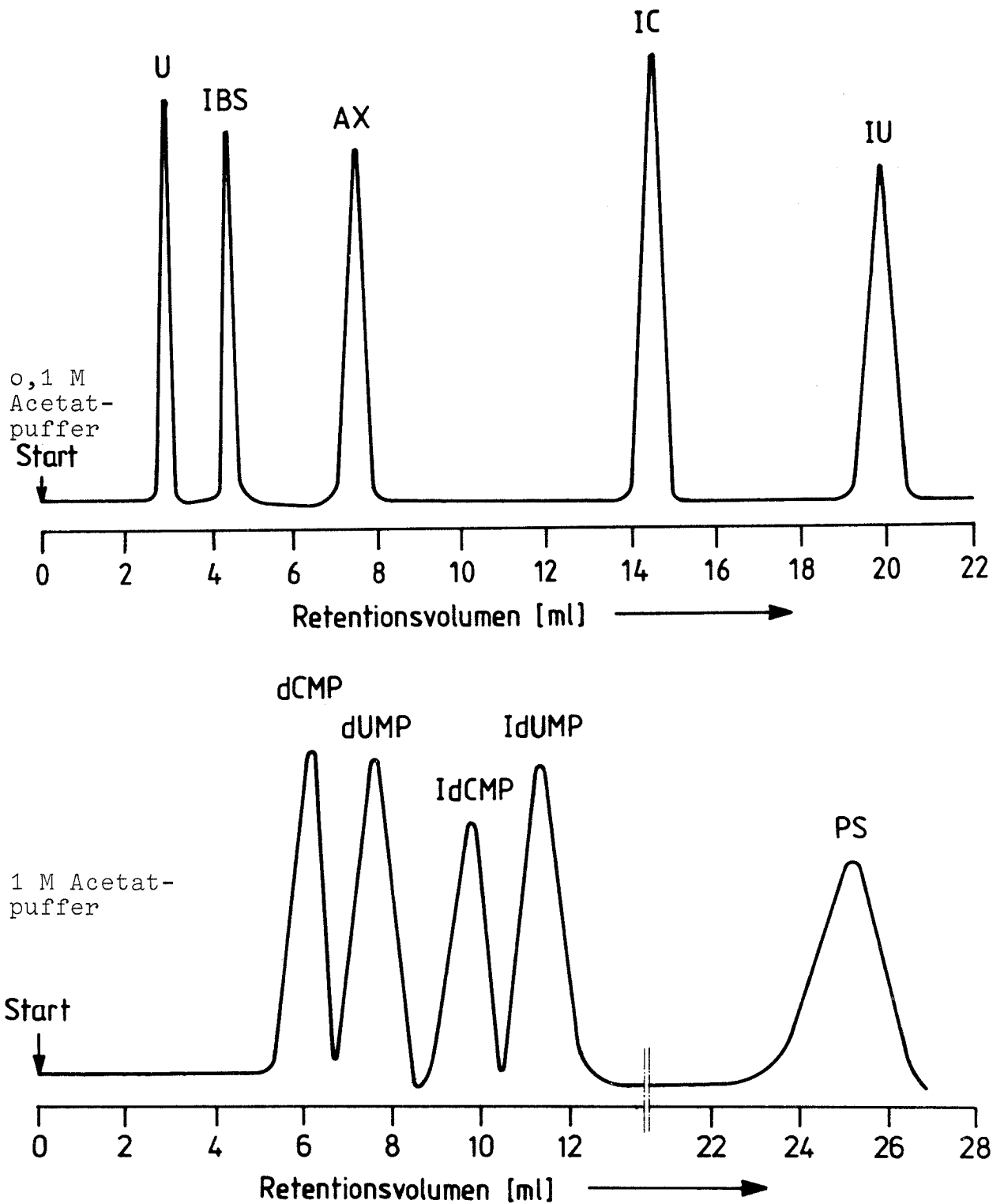


Abb. 14: Chromatogramm einer Testtrennung möglicher Zerfalls- und Radiolyseprodukte von markiertem Ioddesoxycytidin in DNA.

Säule: Aminex A25 (30 x 0,4 cm)

Eluens: 0,1 und 1 M Acetatpuffer in H₂O/EtOH (65:35)

Namenskürzel der Substanzen s. Tab. 3.

Zur Auftrennung des Vorlaufs bzw. zur Überprüfung der Zuordnung eines ^{14}C -Aktivitätspeaks zu einer bestimmten Verbindung wurden noch zwei weitere Trennungen herangezogen:

- a) Trennung auf einer Phasenumkehr Säule (RP18, 50x0,4 cm) mit 0,15 M Ammoniumphosphatpuffer pH 3 als Eluens (Abb. 15)
- b) Trennung auf einer Kationenaustauschersäule (Aminex A6, 30x0,4 cm) mit 0,015 M und/oder 0,15 M Ammoniumphosphatpuffer pH 3 (Abb. 16)

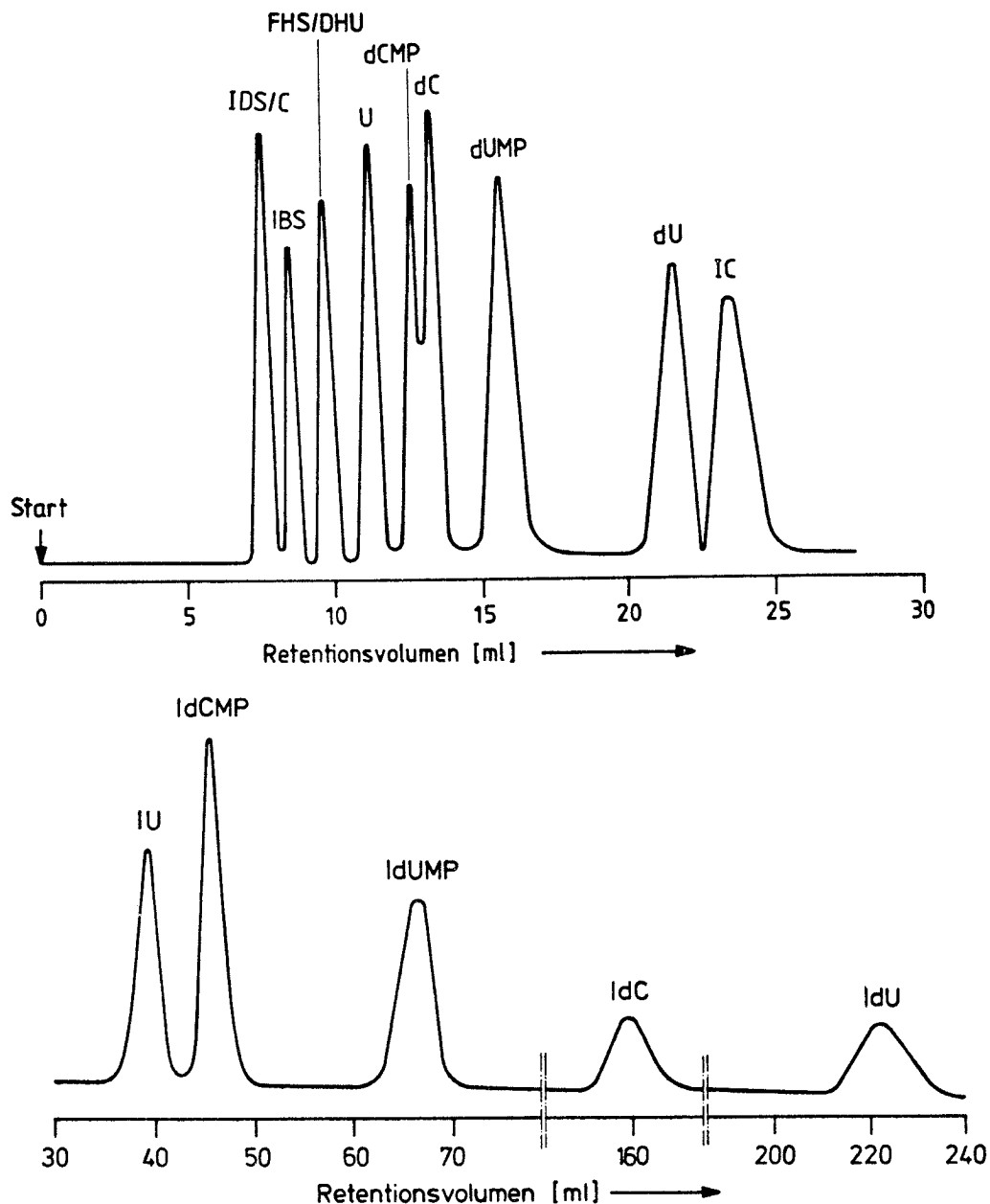


Abb. 15: Testtrennung einiger Referenzsubstanzen auf einer Phasenumkehr-Säule (RP18, 50x0,4 cm), Eluens: 0,15 M Ammoniumphosphat-Puffer pH 3 Namenskürzel der Substanzen s. Tab. 3.

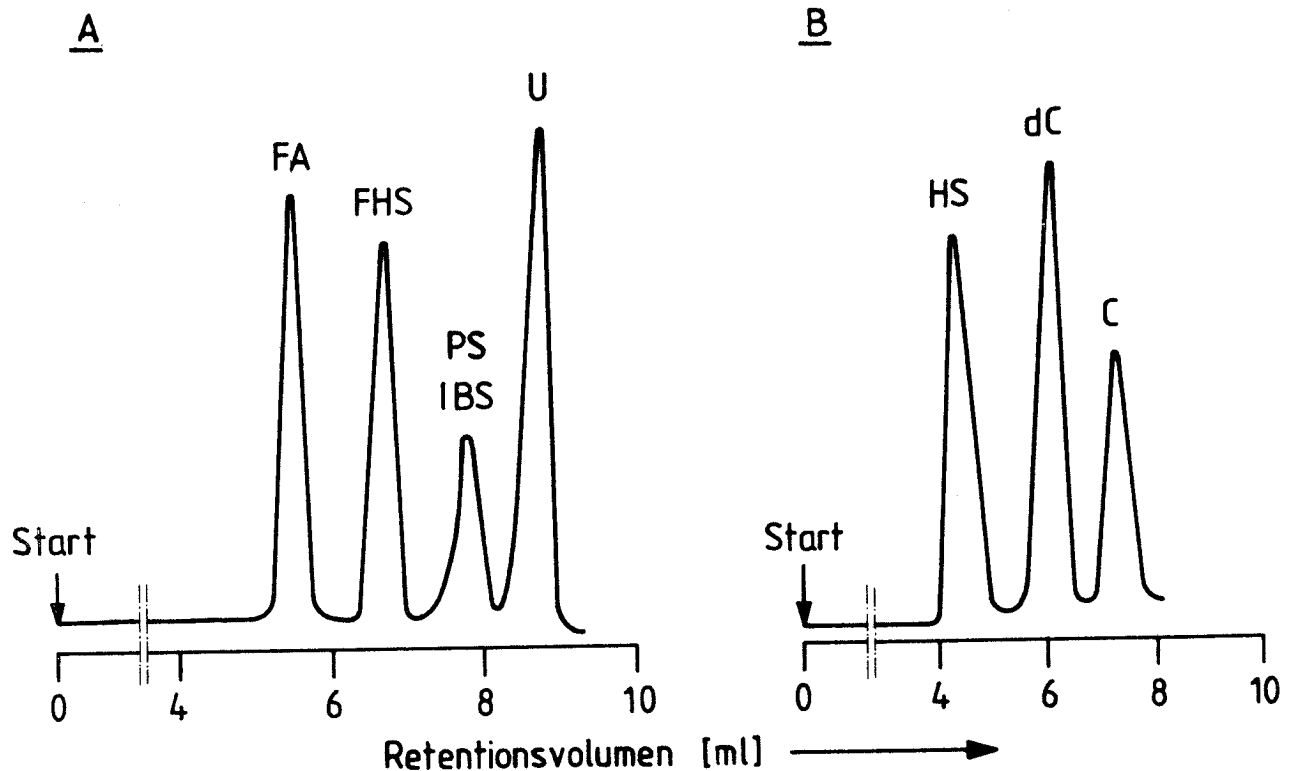


Abb. 16: Auftrennung einiger möglicher Zerfalls- und Radiolyse-
produkte von markiertem Ioddesoxycytidin auf einer
Aminex A6-Säule (30 x 0,4 cm)
Eluens: Ammoniumphosphat-Puffer pH 3,
A) 0,015 M; B) 0,15 M
Namenskürzel der Substanzen s. Tab. 3.

Bei der Aufarbeitung der radioaktiven Proben wurde nach dem Zentrifugationsschritt das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in 500 µl tridestilliertem Wasser aufgenommen und mit 100 µl einer Trägerlösung versetzt, die die in Tab. 3 aufgeführten Substanzen enthielt. Die resultierenden 600 µl Lösung wurden auf einmal injiziert. Das Eluat wurde in 20 ml Probefläschchen aufgefangen und nach Zugabe von Instagel Szintillatorlösung gemessen.

3.13.3. Elektronenmikroskopische Präparationen

DNA-Präparate für die Elektronenmikroskopie wurden nach der Adsorptionsmethode von Davis et al. [81] hergestellt. Etwa 5 μ l einer DNA-Lösung mit 2 μ g/ml DNA, 0,1 mg/ml Cytochrom c, 0,5 M Ammoniumacetat und 1 mM EDTA pH 7,5 wurden auf einer Hypophase aus 0,25 M Ammoniumacetat pH 7,5 gespreitet und mit einem Parlodium-beschichteten Kupfernetzchen abgetupft. Die Probe wurde ca. 1 min in 10 μ M Uranylacetat/80 % Ethanol kontrastiert und anschließend unter Rotation bei 2×10^{-5} Torr mit Pt bedampft (Winkel 7°). Bei 17000-facher Vergrößerung wurden die DNA-Moleküle fotografiert.

3.13.4. Längenbestimmung von DNA-Molekülen

Die Negative der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden 5,5-fach vergrößert (Endvergrößerung: 93500-fach). Mit Hilfe eines elektronischen Längenmeßgerätes (Digitizer HP 9874 A) wurden die DNA-Moleküle jeweils zweimal ausgemessen. Als interner Standard diente PM2-DNA. Im allgemeinen wurden von jeder DNA-Probe 250 - 300 Fragmente vermessen. In den Fällen, in denen DNA-Präparate nur Moleküle einheitlicher Länge enthielten (z.B. inaktive pBR 322-Moleküle), waren es 70 - 100. In graphischen Darstellungen der Längenverteilung der DNA-Moleküle wurde die Länge der einzelnen Fragmente ausgedrückt in % des rechnerischen Werts der pBR 322 Originallänge (L_r). Dieser wurde ermittelt aus der bekannten Zahl der Basenpaare N(4362) [20], dem Abstand zweier Basen d(=0,26 nm nach EtOH-Dehydratisierung [83]) und dem (End-)Vergrößerungsfaktor F.

$$L_r = (N-1) \cdot d \cdot F \quad (33)$$

3.14. Radioaktivitätsmessungen

Die ^{14}C -Aktivitätsmessung im Anschluß an die Flüssigkeitschromatographie erfolgte in einem Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer vom Typ Tricarb der Fa. Packard. Verwendet wurden 20 ml-Polyäthylenfläschchen und Instagel als Szintillatorflüssigkeit.

Absolutbestimmungen von ^{14}C wurden durch Quench-Korrektur der gemessenen Zählraten mit Hilfe einer Eichkurve durchgeführt, die durch Messung verschieden stark gequenchter ^{14}C -Standards ermittelt worden war. Die Genauigkeit betrug $\pm 2\%$. Für Absolutmessungen von Iod-125 wurde die Zählzelle an einem Autogamma-Szintillations-Spektrometer (mit NaI-Kristall) bestimmt, indem ein Aliquot einer Standardlösung mit bekanntem I-125-Gehalt gemessen wurde. Die Zählzelle betrug $47 \pm 2\%$.

Ein besonderes Problem bestand darin, die relativ geringen ^{14}C -Aktivitäten (100-500 cpm) neben einer größeren Menge ^{125}I -Aktivität (einige tausend cpm) zu messen. Zwischen beiden Anteilen konnte man diskriminieren, wenn man mit zwei verschiedenen Energiefenstern arbeitete. Die Zählzelle von Iod-125 hängt nämlich bei Messung im ^{14}C -Kanal stärker vom Quenchfaktor ab als die von ^{14}C . Wird der zweite Kanal so gewählt, daß bei gleicher Energieobergrenze auf den unteren Teil des Energiespektrums verzichtet wird, dann verstärkt sich dieser Effekt noch. Auf diese Weise ist es möglich, die Zählrate für Iod-125 zu erniedrigen ohne gleichzeitig die ^{14}C -Zählzelle allzu stark zu senken. In Fraktionen mit sehr hohem ^{125}I -Untergrund ließ sich die ^{14}C -Aktivität oft erst nach einer Abklingzeit von 4-6 Monaten ermitteln.

3.15. Bestimmung des Doppelmarkierungsgrades

Die spezifische Aktivität des ^{14}C -markierten Desoxycytidintriphosphat (dCTP) wurde durch Vergleich von UV-Massenpeak und Aktivitätsmessung bestimmt. Dabei zeigte sich, daß der ermittelte Wert (340 mCi/mmol) um 25 % unter dem der Firmenangabe lag (Amersham/Buchler: 452 mCi/mmol). Nach der Synthese

von [U- ^{14}C , 5- ^{125}I]-IdCTP wurde eine Absolutbestimmung der ^{125}I -Aktivität in einem Aliquot der chromatographisch gereinigten Substanz durchgeführt und auch hier ein Vergleich mit dem UV-Peak hergestellt. Die Übereinstimmung von der rechnerisch (aus der ^{125}I -Aktivität) zu erwartenden und der aus der UV-Absorption ermittelten Substanzmenge deutet auf vollständige Doppelmarkierung des erzeugten Produktes hin. "Vollständige" Doppelmarkierung bedeutet, daß alle Ioddesoxycytidintriphosphatmoleküle sowohl ^{14}C - als auch ^{125}I -markiert sind. Es heißt aber nicht, daß jedes der 9 C-Atome des Nukleotids ^{14}C -markiert ist. Vielmehr ergibt sich aus der spezifischen Aktivität von 340 mCi/mmol, daß etwa 5 der 9 C-Atome als ^{14}C vorliegen (spezifische Aktivität von ^{14}C bei 100 % Isotopenanreicherung: 62,4 mCi/mAtom).

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1. Radiolyse

Beim Zerfall von Iod-125 treten außer den reinen Zerfallseffekten auch radiolytische Effekte auf, verursacht durch die bei der Transmutation emittierten Elektronen und γ -Quanten. Um Unterschiede zwischen Transmutation und Radiolyse überhaupt herausarbeiten zu können, ist es daher wichtig, das Produktspektrum der Radiolyse durch vergleichende Experimente zu ermitteln.

Zur Untersuchung des Radiolyseanteils wurden, wie im experimentellen Teil (3.12.) beschrieben, ^{14}C -Ioddesoxycytidinmarkierte DNA-Proben mit jeweils 30 μCi Na ^{125}I als interner Strahlenquelle versetzt und unter sonst gleichen Bedingungen wie die doppelt-markierten Proben gelagert. Die Aktivitätskonzentration variierte in den einzelnen Experimenten zwischen 5 und 50 μCi ^{125}I /ml Lösung.

Für die absorbierte Dosis gilt

$$D = K_r \cdot \frac{A_o}{A_{\text{spez}}} (1 - e^{-0,693 \frac{t}{T}}) \cdot \frac{N_L}{m} \cdot \bar{E} \quad (34)$$

- mit K_r : Umrechnungsfaktor von eV/g in rad: $1,60 \cdot 10^{-14}$
 A_o : Anfangsaktivität [mCi]
 A_{spez} : spezifische Aktivität [mCi/mol]; für trägerfreies $^{125}\text{I} \sim 2 \cdot 10^9$ [mCi/mol]
 Z : Zerfallsdauer [d]
 T : Halbwertszeit [d]; für Iod-125: 60 d
 N_L : Loschmidt Zahl: $6,023 \cdot 10^{23}$ [mol $^{-1}$]
 $\bar{E}$: mittlere Elektronenenergie/Zerfall (für Iod-125: 19,8 keV), die in der Probe absorbiert wird
 m : Masse der Probe [g].

Damit ergibt sich für die durchgeführten Experimente nach 6 Monaten eine absorbierte Dosis von $4,2 \cdot 10^2$ bis $4,2 \cdot 10^3$ rad.

Am Ende der Bestrahlungsphase wurden mehr als 90 % der ^{14}C -Aktivität in der hochmolekularen DNA-Fraktion gefunden (Tab. 4). Dies zeigt, daß bei diesen kleinen Dosen und Dosisleistungen die strahlenchemische Zersetzung durch einfache interne Radiolyse keine große Rolle spielt. Die Analyse auf gasförmige Produkte war in allen Fällen negativ (< 0,01 %). Die elektronenmikroskopische Untersuchung der DNA-Fraktion ergab einen leichten Anstieg der Doppelstrangbrüche mit der Dosis. Abb. 18 zeigt die Extremwerte der beobachteten Schäden. Bei Proben, die weniger als 1000 rad absorbiert hatten, war die Zahl der Strangbrüche gegenüber inaktiver Plasmid-DNA nicht erhöht (< 0,1 Bruch/Molekül). Nach Absorption von 4000 rad hatte etwa jedes zweite DNA-Molekül einen Strangbruch.

Tab. 4: Produktverteilung nach interner Radiolyse von ^{14}C -IdC-markierter DNA durch Na^{125}I in verschiedenen wässrigen Medien. Dosis: 4000 rad.

System Produkte	% der gesamten ^{14}C -Aktivität			
	NaCl, N_2 I	NaCl, O_2 II	PP, N_2 III	PP, O_2 IV
I. niedermolekular				
Desoxyuridin	2	-	-	1
Desoxyuridin- monophosphat	-	2	-	-
Ioddesoxycytidin- monophosphat	1	-	<1	-
Iodcytosin	-	-	-	<1
X ^{a)}	1	<1	1	<1
II. hochmolekular				
DNA-Fraktion	94	95	95	92
Aktivitätsbilanz [%]	98	98	97	94

a) Produkt X hatte auf der RP18 Säule (s. Tab. 3) ein Retentionsvolumen von 18 ml

Die Strangbrüche sind statistisch verteilt. Dies ergibt sich aus der Beobachtung, daß die Zahl der Strangbrüche pro Molekül einer Poisson-Verteilung (Gl. 35) folgen [82].

$$P = \frac{e^{-\lambda L} (\lambda L)^n}{n!} \quad (35)$$

L: Zeitintervall der Länge L

λ : Parameter des Poisson-Vorgangs (z.B. mittlere Zahl von Strangbrüchen)

n: Zahl der Ereignisse/Zeitintervall L

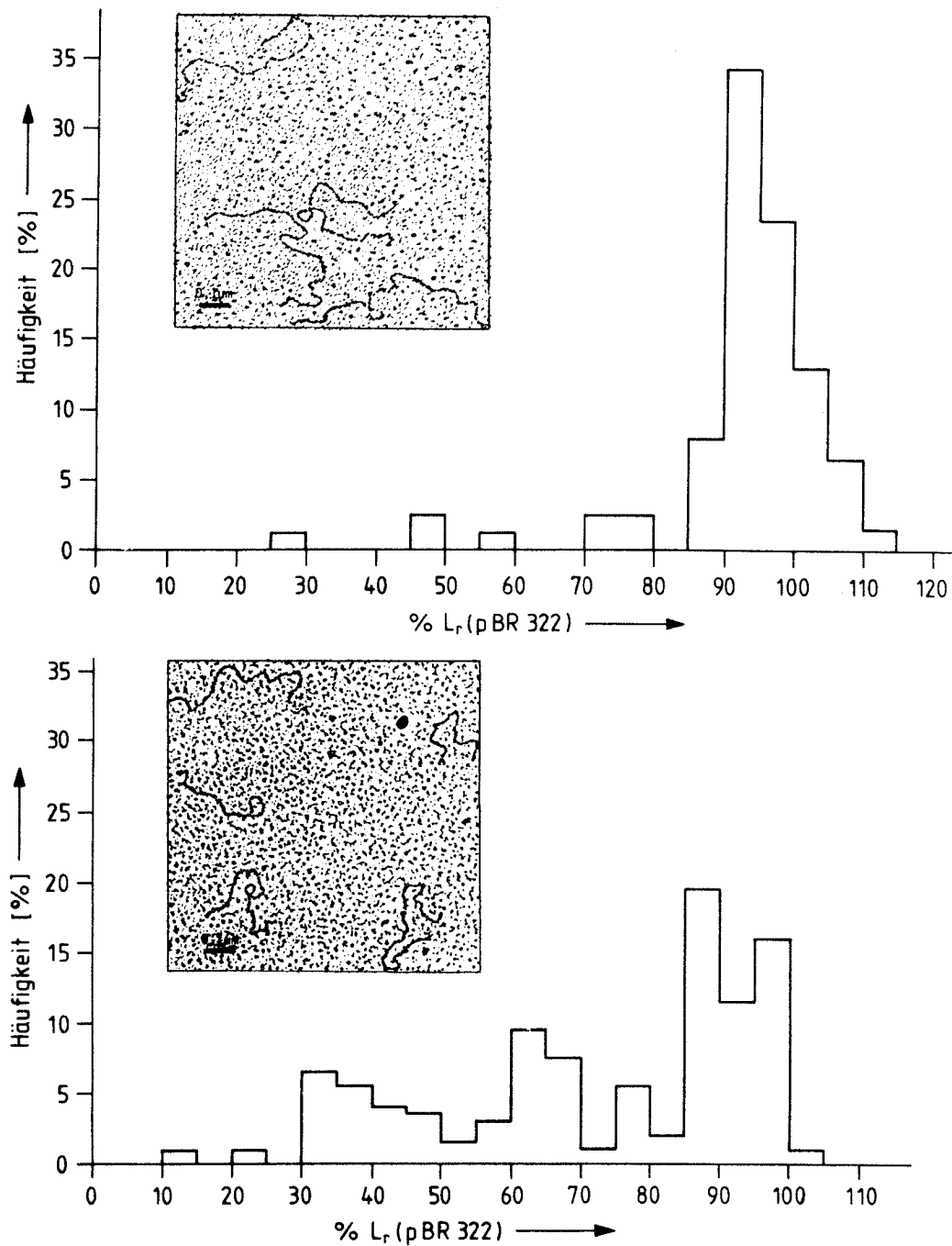


Abb. 17: DNA-Schädigung durch interne Radiolyse. Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit einzelner Fragmentgrößen, ausgedrückt als % des rechnerischen Wertes der pBR 322-Länge (% L_r(pBR 322)). Die eingefügten Bildausschnitte zeigen die dazugehörigen elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Teil A: Längenverteilung in einer Probe nach Absorption von 790 rad (minimale Schädigung) Teil B: Dosis 4300 rad (maximale Schädigung)

Rechnerisch erhält man für den Anteil ungeschädigter Moleküle ($n=0$) und den Anteil der Moleküle mit einem Doppelstrangbruch ($n=1$) folgende Ausdrücke

$$P_0 = e^{-\lambda} \quad \text{und} \quad P_1 = \lambda e^{-\lambda}, \quad (36 \text{ a, b})$$

wobei man für λ die mittlere Zahl der Strangbrüche pro Molekül setzt (vgl. hierzu Abschnitt 4.2.1.2.). Ein Vergleich der beobachteten Häufigkeit von Molekülen mit keinem bzw. einem Bruch mit den rechnerisch ermittelten Werten ergab stets gute Übereinstimmung. Die Abweichung der Werte voneinander war stets kleiner $\pm 2,5 \%$.

DNA-Proben, die höhere Strahlendosen absorbiert hatten, ließen sich im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Proben mit Desoxyribonuklease (DNase)I und Nuklease S1 nicht oder nur unvollständig zu Mononukleotiden abbauen. Der Hauptteil der ^{14}C -Aktivität wurde in diesen Fällen auch nach mehrstündiger Inkubation im Sediment bzw. in der Proteinfraction gefunden. Wahrscheinlich waren die DNA-Stränge doch so stark geschädigt (z.B. veränderte oder fehlende Basen, Einzelstrangenden mit Zuckerderivaten o.ä.), daß die genannten Enzyme sie nicht mehr als Substrat erkannten bzw. durch sie inaktiviert wurden. Solche Effekte wurden schon oft beschrieben [84,85]. Man hat sie sich sogar zunutze gemacht, indem man das veränderte Verhalten von Enzymen gegenüber radiolytisch geschädigter DNA als empfindliches Testsystem für Strahlenschäden benutzt [86]. Die genauen Ursachen für das veränderte Verhalten von DNase I und Nuklease S1 in den oben beschriebenen Experimenten wurde nicht weiter untersucht.

4.2. Chemische und biologische Effekte des Zerfalls von Iod-125 in DNA nach Einbau von [U-¹⁴C, 5-¹²⁵I]-Ioddesoxycytidin

4.2.1. Untersuchungen an DNA-Proben ohne Ligasebehandlung (L⁻-Reihe)

4.2.1.1. Gaschromatographie und HPLC

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Radiolyse beobachtete man bei den doppeltmarkierten DNA-Proben einen beträchtlichen Anteil flüchtiger ¹⁴C-markierter Produkte. Die gaschromatographische Analyse zeigte, daß es sich um die Verbindungen Kohlenmonoxid (¹⁴CO), Kohlendioxid (¹⁴CO₂) und Ethan ([¹⁴C]-C₂H₆) handelte (Abb. 18): Diese Produkte sind also ganz offensichtlich Folgeprodukte der Iod-125-Transmutation.

Die Ausbeute der einzelnen Gase war in den Proben je nach Lagerungsbedingungen sehr unterschiedlich. Sie zeigte eine deutliche Mediumabhängigkeit sowie eine Abhängigkeit von der Konzentration bzw. der Dosisleistung und der Dosis, die unter den gewählten experimentellen Bedingungen direkt proportional zur Konzentration sind.

Die [¹⁴C]-Ethan-Ausbeute war in allen untersuchten Fällen gering und schwankte zwischen 0,5 und 2,5 %. ¹⁴CO wurde mit einer Ausbeute von 1 bis 16 % gebildet, und die ¹⁴CO₂-Menge variierte je nach Versuchsbedingungen zwischen 1 und 80 %. Die Abbildungen 19 und 20 zeigen für verschiedene wässrige Medien die Abhängigkeit der Bildung von ¹⁴CO und ¹⁴CO₂ von der DNA-Konzentration (und damit auch von der Dosisleistung bzw. der absorbierten Dosis) der Lösung. Die miteinander verbundenen Punkte zeigen die Daten der Versuchsreihe von doppeltmarkierten DNA-Proben ohne Ligasebehandlung (L⁻). Die mit L⁺ bezeichneten Punkte werden in Abschnitt 4.2.2. behandelt.

Beim Verlauf der CO-Kurven beobachtet man für das System NaCl, N₂(I) einen leichten Anstieg der gebildeten Gasmenge mit der DNA-Konzentration. In Gegenwart von Sauerstoff fällt dagegen die Ausbeute an CO in NaCl-Lösung (NaCl, O₂ = Medium II) stark ab. Auffällig ist dabei die drastische Änderung des

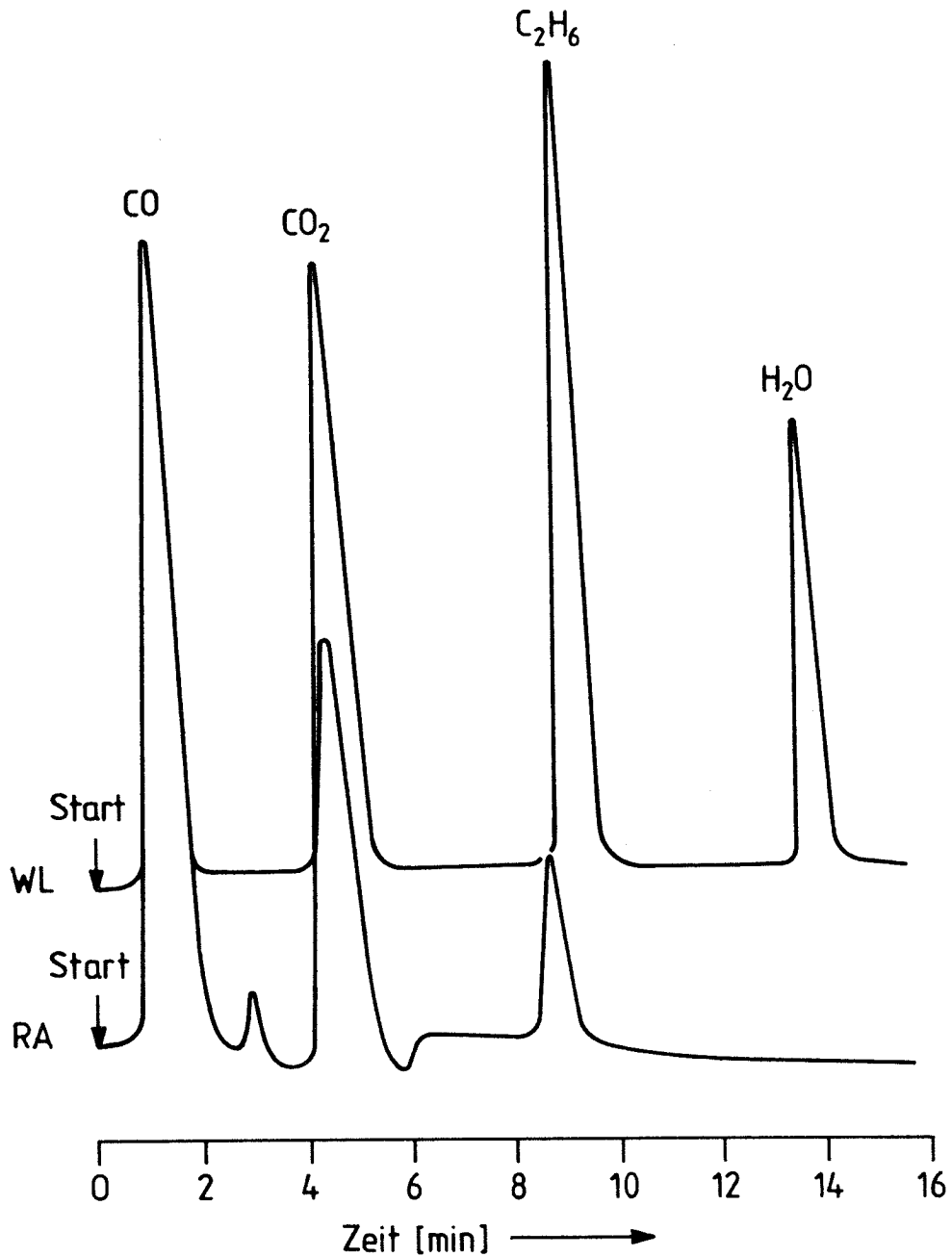


Abb. 18: Gaschromatographische Trennung der flüchtigen Komponenten einer doppeltmarkierten DNA-Probe auf einer Porapak S-Säule (Bedingungen s. 3.13.1.) nach 4-monatiger Lagerung bei 4°C. WL: Signal des Wärmeleitfähigkeitsdetektors; RA: Signal des Gasproportionalzählrohrs.

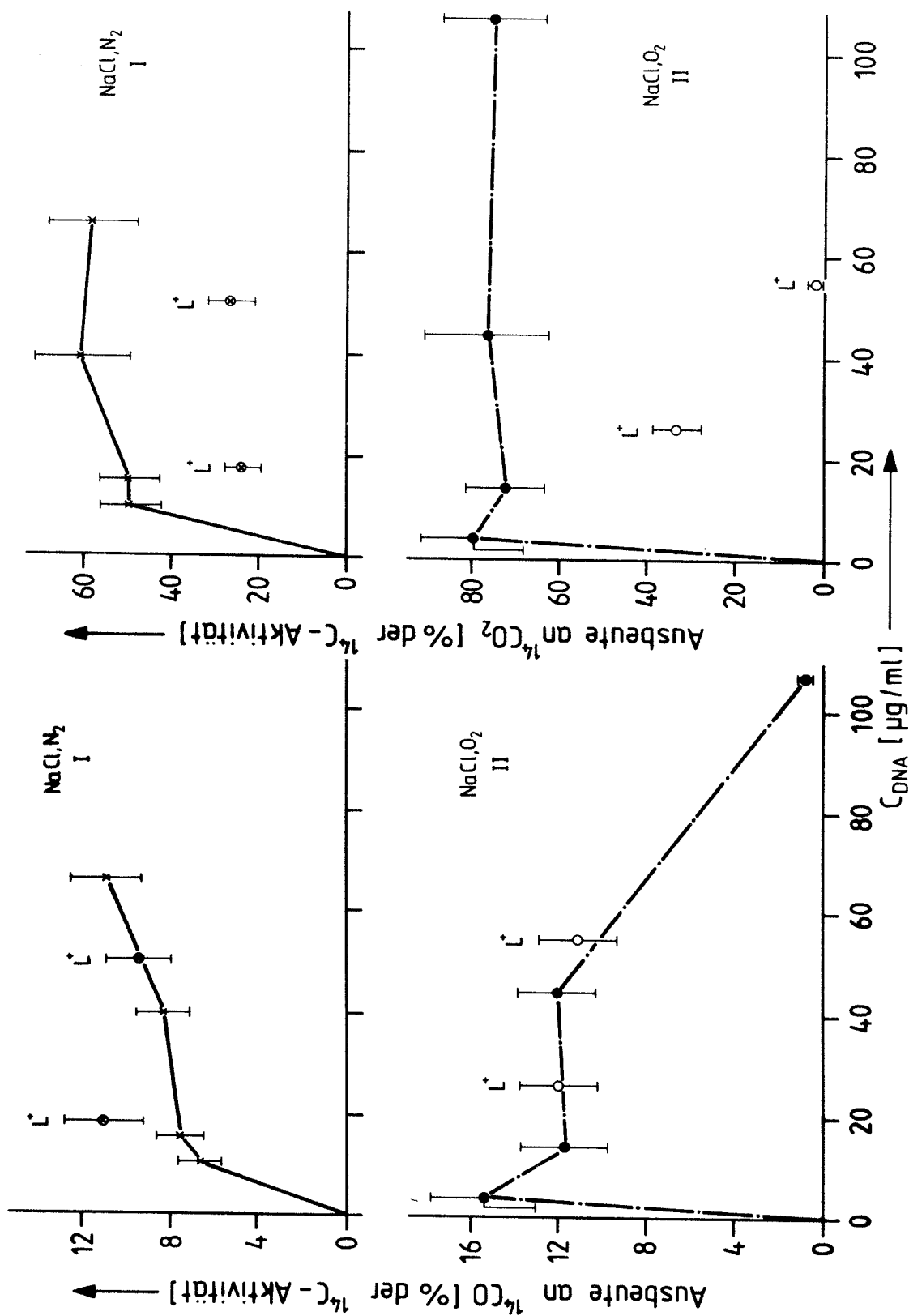


Abb. 19: Konzentrationsabhängigkeit der ^{14}C - CO - und ^{14}C - CO_2 -Bildung in N_2 - und O_2 -gesättigter NaCl -Lösung nach Zerfall von Iod-125 in DNA. Vergleich zwischen L^- (die miteinander verbundenen Punkte) und L^+ -Reihe (Diskussion s. Abschnitt 4.2.2.)

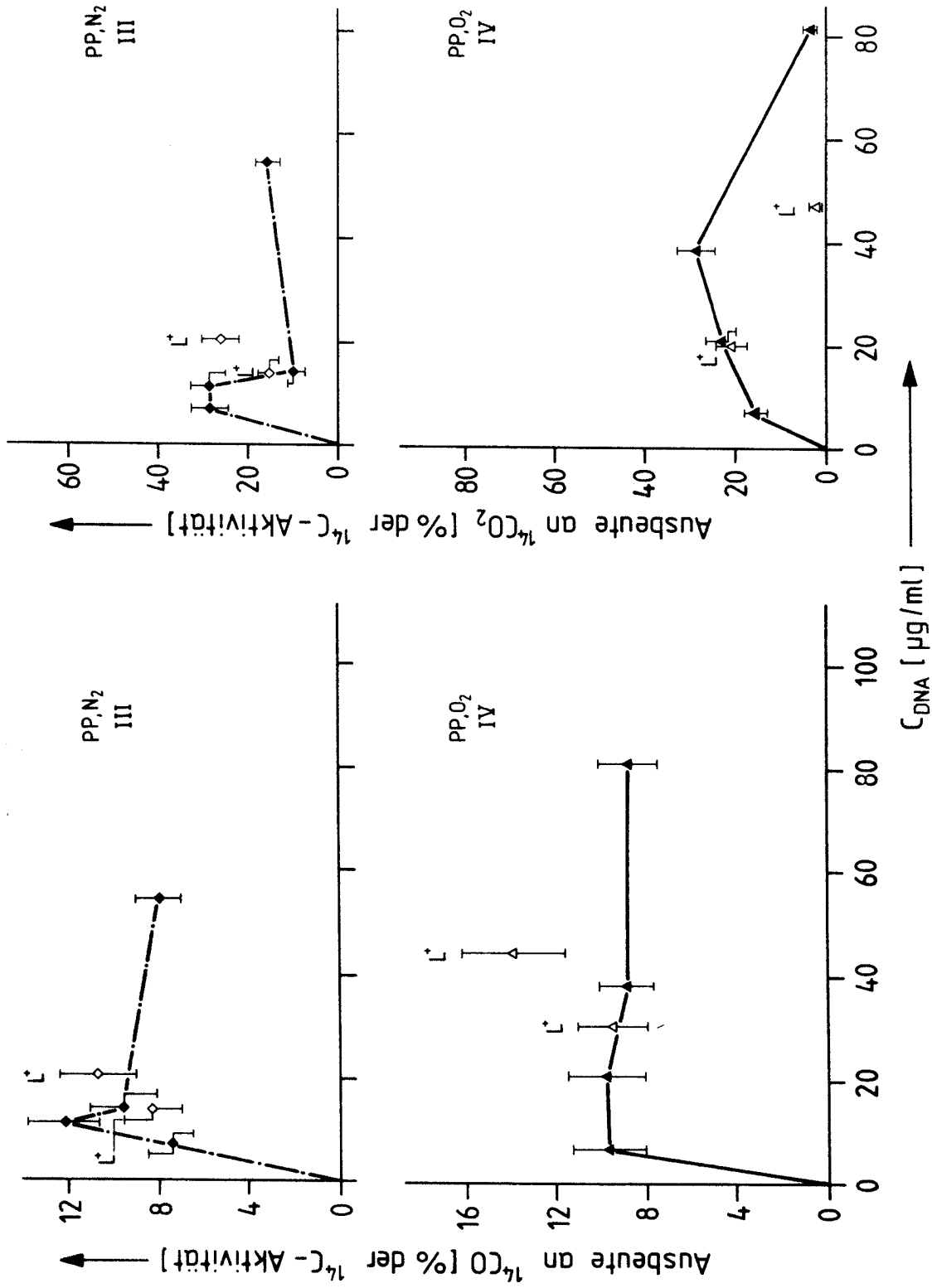


Abb. 20: Konzentrationsabhängigkeit der ¹⁴CO- und ¹⁴CO₂-Bildung in N₂- und O₂-gesättigtem Phosphatpuffer nach Zerfall von Iod-125 in DNA. Vergleich zwischen L⁺- (die miteinander verbundenen Punkte) und L⁻-Reihe (Diskussion s. Abschnitt 4.2.2.)

Kurvenverlaufs im Bereich kleiner Konzentrationen. Ein ähnliches Verhalten beobachtet man auch in Phosphatpuffer (PP), der mit Stickstoff gesättigt ist (Medium III). In Sauerstoff-gesättigter Phosphatpufferlösung (IV) scheint dagegen schon bei sehr niedriger DNA-Konzentration ein Plateau erreicht zu sein, das bei etwa 9 - 10 % Kohlenmonoxid liegt und über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich praktisch konstant bleibt. Beim Verlauf der CO_2 -Kurven fällt auf, daß in NaCl-Lösung deutlich mehr Gas gebildet wird als in Phosphatpuffer. In Medium II wird schon bei DNA-Konzentrationen von weniger als 10 $\mu\text{g/ml}$ ein sehr hohes Plateau erreicht. In Medium I ist der Anstieg geringer. Der Plateauwert liegt um etwa 20 % niedriger. Sehr viel komplexer erscheint der Verlauf in Phosphat-haltiger Lösung. Während in Medium III, wie auch schon für den Verlauf der CO-Kurve, im Bereich von 10 $\mu\text{g/ml}$ eine deutliche Änderung des Kurvenverlaufs beobachtet wird, steigt die CO_2 -Ausbeute in System IV nicht so steil an und fällt bei höherer Konzentration wieder ab.

Die Fehlerbreiten der Meßwerte sind beträchtlich, wobei die Verlässlichkeit der CO-Daten aufgrund eines geringeren experimentellen Fehlers höher eingeschätzt werden darf als die der CO_2 -Werte. Es zeigte sich nämlich nach den ersten Gasanalysen, die wie in Abschnitt 3.13.1. beschrieben, ohne Durchleiten des Trägergasgemisches abgetölpert worden waren, daß unter diesen Bedingungen noch leicht flüchtige Verbindungen in der Lösung zurückblieben. In einigen Folgeexperimenten wurden die Proben daraufhin fraktioniert abgetölpert, d.h. zunächst wurde die Gasphase ohne durchleiten der Trägergase aufgefangen und analysiert. Anschließend wurde nochmals Trägergasgemisch durch die flüssige Phase geleitet, abgetöplert und wie zuvor aufgetrennt. Die Analyse dieser zweiten Fraktion ergab zum Teil noch beträchtliche Mengen an CO_2 (bis 70 % der Gesamt- CO_2 -Menge!). In keinem dieser Experimente wurde noch weiteres CO, C_2H_6 oder sonstige Verbindungen gefunden. Ein dritter Fraktionierungsschritt ergab keine weiteren gasförmigen Produkte mehr. Für eine quantitative Erfassung von CO_2 war es also dringend notwendig, das Trägergasgemisch durch die Pro-

benlösung zu leiten. CO und C₂H₆ ließen sich auch mit der herkömmlichen Töplertechnik vollständig aus der Lösung entfernen. Einige der CO₂-Werte sind deshalb mit einem Fehler von $\pm 30\%$ behaftet, während sich für die übrigen Meßwerte ein Fehler von 15 - 17 % (+) ergibt.

Eine Diskussion der beobachteten Mediumabhängigkeit der Gasbildung soll erst im Zusammenhang mit den Ergebnissen der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Analyse erfolgen.

Ausmaß und Verlauf der Konzentrationsabhängigkeit sind überraschend und zum augenblicklichen Zeitpunkt der Untersuchungen nicht befriedigend zu erklären.

Es sollen daher nur einige allgemeine Bemerkungen hierzu gemacht werden. DNA-Moleküle in wässriger Lösung dürfen nicht einfach als im Gleichgewicht mit einem äußeren Milieu befindliche Teilchen behandelt werden. Sekundär- und Tertiärstruktur der Moleküle reagieren besonders in verdünnter Lösung sehr empfindlich auf geringste Schwankungen in der Lösungsmittelzusammensetzung. Ionenstärke, Pufferkapazität des Elektrolyten, Ladungsdichte und Polarisierbarkeit der Kationen und Anionen können die Gestalt der DNA-Solvathülle und die Stabilität der Helixstruktur stark beeinflussen [87-89]. Ursachen dafür sind u.a. Wechselwirkungen der geladenen Phosphatgruppen und der Basen der DNA-Helix mit Ionen des umgebenden Lösungsmittels, die Aufhebung von Wasserstoffbrücken, die Dehydratisierung der Helix und Entropieeffekte, bedingt durch die Bildung oder Zerstörung von geordneten Strukturen (Cluster). Auch ist bekannt, daß die Ausbeute der Primärradikale der Wasserradio-lyse von der Konzentration gelöster Stoffe und dem pH-Wert der Lösung abhängen (vgl. z.B. [38]). Die bisher vorliegenden Daten stammen aber aus Untersuchungen mit höher konzentrierten Systemen (molare Konzentrationen) und sind nicht notwendigerweise auf die Verhältnisse in stark verdünnter Lösung übertragbar.

In Tab. 5 ist für eine DNA-Konzentration von 40 µg/ml die Produktverteilung der ¹⁴C-markierten Verbindungen nach Zerfall von Iod-125 in doppeltmarkierter DNA für die Medien I-IV dar-

Tab. 5: Produktverteilung nach dem Zerfall von ^{125}I in doppelt-markierter DNA (ohne Ligase) für verschiedene wässrige Medien. Die DNA-Konzentration beträgt jeweils etwa 40 $\mu\text{g/ml}$.

System Produkt	% der eingesetzten		^{14}C -Aktivität*	
	NaCl, N_2 I	NaCl, O_2 II	PP, N_2 III	PP, O_2 IV
I. flüchtig				
CO_2	61	76	14	29
CO	8	12	8	9
C_2H_6	<1	1	1	1
II. nicht-flüchtig				
Cytosin	2	-	-	-
Uracil	6	1	4	4
Desoxycytidin	1	-	-	-
Desoxyuridin	4	2	5	1
Desoxycytidin- monophosphat	2	1	1	-
Desoxyuridin- monophosphat	7	3	6	3
Isobarbitursäure/ 5-Hydroxyhydantoin	4	4	3	-
Formylharnstoff	2	-	-	1
III. hochmolekulare Fraktion				
	-	-	-	-
^{14}C -Bilanz	98	100	42	48

* Experimenteller Fehler bei den gaschromatographischen Analysen der flüchtigen Produkte: 15-20 %. Bei den nicht-flüchtigen Produkten liegt der Fehler bei mindestens 20-30 % (s. Abschnitt 3.14.)

gestellt. Anhand dieser Daten soll beispielhaft für die Doppelmarkierungsexperimente ohne Ligasebehandlung die Verteilung der ^{14}C -Aktivität auf flüchtige und nicht-flüchtige Zerfallsprodukte des Ioddesoxycytidins erklärt werden. Wegen der geringen Ausbeuten der einzelnen nicht-flüchtigen Komponenten und der damit verbundenen Unsicherheit der Meßdaten soll auf die Diskussion von Konzentrationseffekten verzichtet werden.

Es wurden typische Werte aus dem Plateau- bzw. Maximumbereich der Abb. 19 gewählt und zwar von solchen Proben, bei denen die Gasphase nach Durchleiten des Trägergasgemisches abgetölpert wurde. Die erwähnten Probleme bei der quantitativen Bestimmung von CO_2 spielen daher für die Beurteilung dieser Ergebnisse keine Rolle.

Im allgemeinen wurden 10-30 % der ^{14}C -Aktivität als nicht-flüchtige niedermolekulare Produkte nachgewiesen, wobei die Ausbeuten in Stickstoff-haltiger Lösung etwas höher waren als in Sauerstoff-gesättigtem Medium. Im Gegensatz zur Radiolyse beobachtete man keine ^{14}C -Aktivität in der hochmolekularen Fraktion. Von den Pyrimidinderivaten wurden mehr Uracil- als Cytosin-Abkömmlinge gebildet. Außer den aufgeführten Verbindungen wurden auch noch geringe Mengen ^{125}I -haltige Verbindungen (insges. <2 %) gefunden (z.B. Iodcytosin, Ioduracil). Dabei dürfte es sich um Sekundärprodukte aus Reaktionen von abgespaltenem Iod mit Zerfalls- und Radiolyseprodukten handeln. Von der verbliebenen Iod-125-Aktivität waren nämlich zum Zeitpunkt der Analyse nur noch 10-20 % in der DNA gebunden. Die restlichen 80-90 % lagen als I_2 oder Iodid in der Lösung vor.

Die nicht-flüchtigen Verbindungen wurden, wie im experimentellen Teil (3.13.2.) beschrieben, durch ihr Retentionsverhalten auf mindestens zwei verschiedenen Säulen charakterisiert. Die angegebenen Ausbeuten wurden sowohl direkt nach der Aufarbeitung als auch 4 und 6 Monate danach gemessen. In dieser Zeit war der Iod-125-Untergrund auf ein Viertel bzw. ein Achtel des ursprünglichen Werts abgesunken, so daß sich die ^{14}C -Aktivität mit größerer Sicherheit bestimmen ließ.

Wie Tab. 5 zeigt, ist nur bei den Proben mit NaCl-Lösung als Medium eine quantitative Bilanz der ^{14}C -Aktivität erreicht worden. In den Phosphatpuffersystemen III und IV dagegen wurde nur knapp die Hälfte der Aktivität wiedergefunden. Im Folgenden soll eine mögliche Erklärung hierfür gegeben werden:

Die chromatographischen Trennbedingungen wurden in erster Linie nach dem Kriterium ausgewählt, die verschiedenen Zerfallsprodukte der Basenkomponente des markierten Nukleotids möglichst vollständig nachzuweisen, weil davon ausgegangen werden durfte, daß im Falle einer Schädigung des Nukleotids, der Pyrimidinring als unmittelbarer Nachbar des zerfallenen Iodatoms zuerst betroffen sein sollte. Das Spektrum der durch Strahlenschädigung von Pyrimidinbasen entstehenden Produkte ist bereits gut untersucht, so daß man sich bei der Planung der analytischen Experimente auf eine relativ gesicherte Gruppe von chemischen Verbindungen konzentrieren konnte. Die meisten dieser Substanzen sind auch im Handel erhältlich. Die Zerfalls- und Radiolyseprodukte des Desoxyriboserests dagegen umfassen eine recht große Zahl von Verbindungen, die jeweils nur in geringer Menge entstehen (vgl. z.B. [57-59]). Die wenigsten dieser Substanzen sind kommerziell zugänglich und ihre Synthese war wegen der zeitlichen Begrenzung der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Diese Produkte umfassen vor allem Hydroxy- und Dicarbonsäuren unterschiedlicher Kettenlänge sowie phosphathaltige Substanzen. Solche stark anionischen Verbindungen lassen sich aber mit den verwendeten Trennsystemen nur schwer oder gar nicht nachweisen. Zum einen werden sie ähnlich wie Iodid mit ethanolischem Acetatpuffer nicht von der Aminex-A27-Anionenaustauschersäule eluiert. Zum anderen erscheinen sie zusammen mit ^{125}I -Iodid im Totvolumen der Kationenaustauscher- und Phasenumkehrsäule. Dort sind sie dann wegen des hohen Aktivitätsunterschieds zwischen ^{125}I und ^{14}C (>1000-fach) nicht mehr nachzuweisen.

Die im experimentellen Teil beschriebenen Trennungen sind mit großer Wahrscheinlichkeit dazu geeignet, den Hauptanteil von möglichen Zerfallsprodukten von Cytosin zu erfassen. Es darf deshalb davon ausgegangen werden, daß es sich

bei den in den Phosphatpuffersystemen III und IV tatsächlich nachgewiesenen Substanzen im wesentlichen um Zerfallsprodukte der Base handelt. Diese Annahme wird auch durch die Bilanz der nachgewiesenen ^{14}C -Aktivität gestützt:

Bei dem eingesetzten Ioddesoxycytidin waren alle 9 C-Atome ^{14}C -markiert (s. Abb. 1, Abschnitt 1). Auf die Base entfallen 4, auf den Zucker 5 C-Atome. Also macht die ^{14}C -Aktivität der Zerfallsprodukte des Iodcytosinrests 44 % ($= \frac{4}{9}$) und die der Desoxyribose 56 % ($= \frac{5}{9}$) der Gesamtaktivität aus. Zieht man von der in Phosphatpuffer-Lösung gefundenen ^{14}C -Aktivität den Anteil der Zuckeraktivität ab, der sich in den nachgewiesenen Nukleosiden (Desoxyuridin, Desoxycytidin) und Nukleotiden (dCMP, dUMP) befindet, so erhält man Werte von 35-46 %. Diese Zahlen stimmen innerhalb der Fehlergrenzen recht gut mit den theoretisch möglichen 44 % der Gesamtaktivität überein, die auf den Cytosinrest entfallen.

Wenn es sich bei den in den Medien III und IV nachgewiesenen Verbindungen in erster Linie um die Zerfallsprodukte der Base handelt, so ergibt das folgendes Bild: Nach Zerfall des gebundenen Iod-125-Atoms wird der Cytosinrest hauptsächlich zu CO und CO_2 fragmentiert. Daneben entstehen noch Ethan und einige Prozent nicht-flüchtiger Zerfallsprodukte, unter denen Uracil-abkömmlinge, d.h. die Desaminierungsprodukte der entsprechenden Cytosinverbindungen dominieren. Aus Tab. 5 geht hervor, daß die Ausbeuten an CO, C_2H_6 und den meisten nicht-flüchtigen Produkten nahezu mediumunabhängig sind. Lediglich die Ausbeute an CO_2 zeigt einen starken Rückgang in Phosphatpuffer. Dieser läuft direkt parallel mit der schlechteren Aktivitätsbilanz bei Proben mit Phosphatpuffer als Medium. Die Annahme, die fehlende ^{14}C -Aktivität sei hauptsächlich auf die nicht nachgewiesenen Zerfallsprodukte der Desoxyribose zurückzuführen, erlaubt den Schluß, daß der Zuckerrest in NaCl-Lösung weitgehend in CO_2 fragmentiert wird, während er durch Phosphatpuffer vor vollständiger Zerstörung geschützt ist und zu chromatographisch nicht erfaßten Produkten wie Hydroxy- und Dicarbonsäuren führt. Aus der Base andererseits entstehen nahezu mediumunabhängig in allen untersuchten Systemen die gleichen Zerfallsprodukte, d.h. im wesentlichen das gesamte CO und das restliche CO_2 .

Arbeiten über Transmutationseffekte bei Desoxyribose oder Desoxyribose-haltige Verbindungen liegen bisher nicht vor. Als Radiolyseprodukt von Zuckern wurde CO_2 nur vereinzelt beobachtet. So beschrieben Scholes und Weiss [90] 1953 die Entstehung von CO_2 aus D-Ribose nach Röntgenbestrahlung wässriger Lösungen des Zuckers. Von Sonntag und Dizaroglu [91] fanden CO_2 in γ -bestrahlter kristalliner Ribose, konnten es aber nicht in entsprechend bestrahlten wässrigen Lösungen nachweisen.

Die Entstehung von CO und CO_2 aus Pyrimidinbasen nach Zerfall von kovalent gebundenem Iod-125 wurde erstmals von Deutzmann und Stöcklin [12] für doppeltmarkiertes $[2\text{-}^{14}\text{C}, 5\text{-}^{125}\text{I}]$ -Ioduracil beschrieben. Nach externer Bestrahlung entsprechender einfachmarkierter Ioduracillösungen konnten auch bei extrem hohen Dosen nur Spuren von CO_2 aber kein CO nachgewiesen werden. Auch sonst findet man in der Literatur keinerlei Hinweise, daß CO bei der externen Radiolyse von Pyrimidinen jemals beobachtet wurde.

Ethan wurde bisher weder als Transmutations- noch als Radiolyseprodukt von Pyrimidinen beschrieben. Es dürfte sich dennoch um ein Zerfallsprodukt von Cytosin handeln, da die Bildung dieses Gases, ähnlich wie die Entstehung der anderen Zerfallsprodukte der Base, in den untersuchten Systemen praktisch keinen Lösungsmittteleffekt zeigt. Sehr wahrscheinlich handelt es sich um ein Fragment, das aus den C-Atomen 5 und 6 besteht. Dort ist die einzige Stelle in der Base, an der eine C_2 -Einheit bereits vorgebildet ist. Da in den meisten Arbeiten über Zerfallseffekte an Pyrimidinen aber 2- ^{14}C -markierte Basen eingesetzt wurden [z.B. 23,80,92,93], sollte der Nachweis dieses Gases bisher auch nicht möglich gewesen sein.

Bevor auf eine mechanistische Diskussion der Bildung von CO und CO_2 eingegangen wird, sollen zunächst die verschiedenen, teilweise schon behandelten (s. Abschnitt 2.1.) Prozesse, die als Folge des Auger-Effekts zur Schädigung und speziell zur Fragmentierung des Restmoleküls führen können, kurz zusammengefaßt werden.

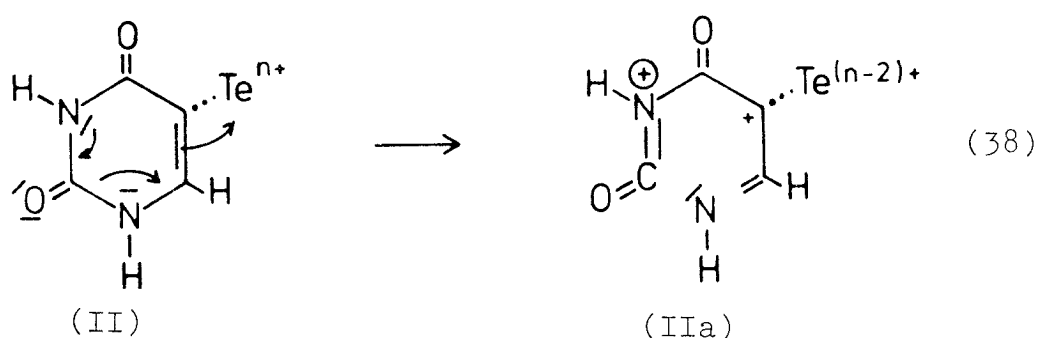
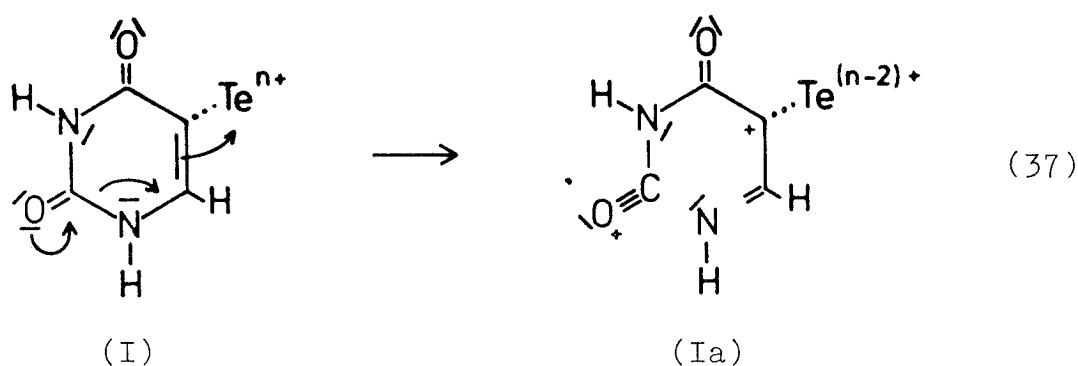
Erstens kann durch Ionisation nach den beiden Auger-Kaskaden bei K-Einfang und nachfolgender innerer Konversion eine Schädigung des Molekülrests erfolgen. Das gleiche kann durch Anregung des Moleküls nach bereits abgeschlossener Ladungsneutralisation eintreten. Weiter kann durch die emittierten Auger-Elektronen kurzer Reichweite ein direkter Strahleneffekt für die Schädigung verantwortlich sein oder es handelt sich um die Folgen von Reaktionen des Molekülrests mit Radikalen, die in hoher lokaler Konzentration gebildet werden (= indirekter Effekt).

Fragmentierung als Folge direkter Ionisation und Anregung bei der Ladungsneutralisation sollte in erster Linie bei Molekülen in nächster Nachbarschaft des zerfallenden Atoms eine Rolle spielen. In Frage kommen neben dem direkten Molekülrest, an den das zerfallende Atom gebunden ist auch benachbarte Lösungsmittelmoleküle, über die Elektronenübertragungsreaktionen erfolgen können.

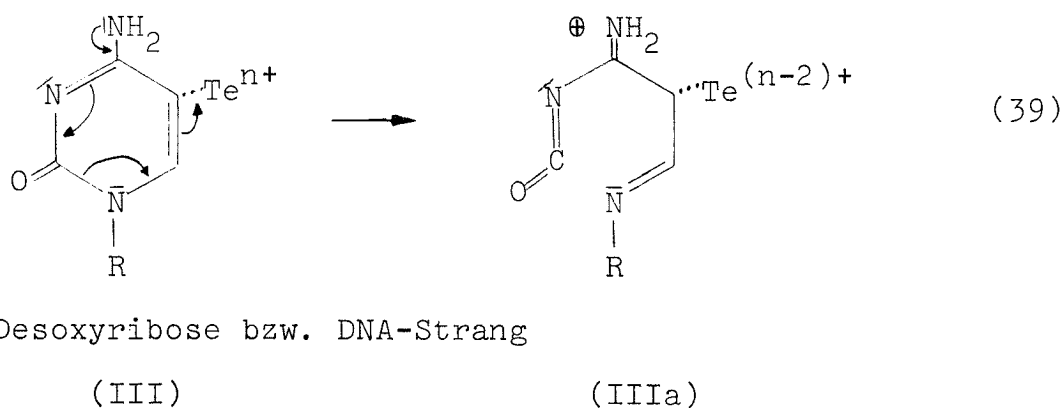
Radikalreaktionen der Auger-Radiolyse sollten sich qualitativ nicht von denen unterscheiden, die durch externe Röntgen- oder Gammabestrahlung ausgelöst werden. Bei ersteren treten jedoch wesentlich höhere lokale Konzentrationen an reaktiven Spezies auf, durch die Dosis- und Dosisleistungseffekte verursacht werden können. Außerdem befindet sich der Molekülrest nach Zerfall des den Auger-Effekt auslösenden Atoms im Zentrum einer Spur mit einer Vielzahl von Radikalen. Wegen dieser doch recht deutlichen Unterschiede zur Gamma-Radiolyse sollte man die indirekte Schädigung von Molekülen durch Radikale der Auger-Radiolyse mit zu den Zerfallseffekten rechnen.

Zur Frage der Bildung von CO und CO₂ aus Pyrimidinbasen hat Deutzmann [80] einen hypothetischen Mechanismus diskutiert. In dem von ihm behandelten Fall des Ioduracil sollte der Uracilring schon bei der intramolekularen Ladungsneutralisation des Tellur-Ions im Anschluß an die erste Auger-Kaskade zerstört oder stark geschädigt werden. Durch Folgereaktionen angeregter Spezies analog Ia und IIa in Gl. 37 und 38 sollten dann während der zweiten Auger Kaskade (s. Abb. 4) CO und

CO₂ (nach Reaktion mit H₂O) abgespalten werden:



Die Annahme eines solchen Reaktionsschemas, bei dem die beiden Gase durch verschiedene Folgereaktionen aus der gleichen Vorstufe entstehen, konnte im Falle des Ioduracils recht gut die Beobachtung erklären, daß CO und CO₂ stets in einem festen Verhältnis von 2:1 gebildet wurden. Ein ähnlicher Mechanismus läßt sich auch für Cytosin formulieren. Hier sollte wegen der besseren Elektronendonoreigenschaften der basischen Amino-Gruppe an C-Atom 4 die Ladungsübertragung auf das Tellur-Ion noch erleichtert sein.



R = Desoxyribose bzw. DNA-Strang

N-3 kann ein Proton der positiv geladenen Iminogruppe aufnehmen. Es lassen sich dann Grenzstrukturen völlig analog zu Ia und IIa formulieren, die zur Bildung von CO und CO₂ führen können. Aus dem zurückbleibenden Molekülrest kann nach Hydrolyse der Iminogruppe auch von C-4 CO und CO₂ freigesetzt werden.

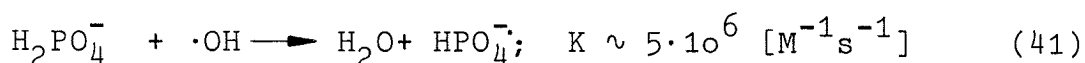
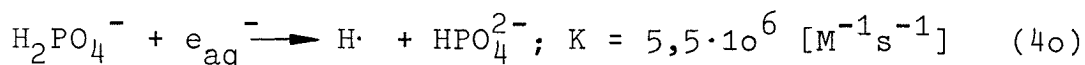
Auch in dem hier untersuchten Beispiel von Ioddesoxycytidin in DNA wurde für die meisten Experimente ein in erster Näherung konstantes Verhältnis von CO₂ zu CO beobachtet. Das lag für Experimente im NaCl-System bei etwa 7:1 und bei Experimenten im PP-System bei (2 bis 3):1, wenn man die Gesamt-CO₂-Ausbeute berücksichtigte. Wurde bei der Berechnung aber nur der CO₂-Anteil, der aus der Base stammt, berücksichtigt, so erhielt man in allen Fällen ein Verhältnis CO₂:CO von etwa (2 bis 3):1 statt 1:2, wie Deutzmann im Fall des [2-¹⁴C,5-I¹²⁵I]-Ioduracil.

Einerseits könnte es sein, daß die Meßwerte der CO₂-Bestimmung bei Deutzmann etwas zu niedrig liegen, da er beim Abtöplern der Gasphasen das Trägergasgemisch nicht durch die Probenlösung leitete. Wie weiter oben beschrieben, scheint das aber für eine quantitative Erfassung speziell von CO₂ dringend notwendig zu sein. Aber selbst wenn nur die Hälfte der CO₂-Aktivität gemessen worden wäre, was wiederum wegen der guten Aktivitätsbilanz unwahrscheinlich sein dürfte, würde sich das Verhältnis CO₂:CO nur von 1:2 auf 1:1 erhöhen. Wegen der strukturell sehr ähnlichen Verhältnisse an den C-Atomen 2 und 4 (Lactam bzw. Lactamidin) sollten auch die Mengenverhältnisse der Gase, die von beiden C-Atomen stammen, ähnlich sein. Dann läßt sich aber das tatsächlich beobachtete CO₂/CO-Verhältnis von (2 bis 3):1 nur noch dadurch erklären, daß C-5 und C-6 praktisch nur CO₂ liefern, ein weiterer Hinweis auf eine offensichtlich besonders ausgeprägte Zerstörung der Doppelbindung zwischen C5 und C6 nach Zerfall des in Position 5 gebundenen Iod-125-Atoms.

Es erscheint unwahrscheinlich, daß auch der Desoxyriboseresest bereits bei der Ladungsneutralisation des Te-Ions fragmentiert wird. Wie im obigen Schema gezeigt, können über den

Cytosinring mit seinem teilweise aromatischen Charakter wesentlich mehr und wesentlich leichter Elektronen abgezogen werden als über die σ -Bindung zwischen N-1 und C-1 des Zuckers. Es ist bekannt, daß sich die π -Elektronenwolken der DNA-Basen teilweise überlappen. Dadurch sollte eine Elektronenübertragung vom Cytosinrest auf das Te-Ion noch erleichtert werden, weil die entstehenden positiven Ladungen über mehrere Basen verteilt werden können [94,95]. Letztlich ist auch die direkte räumliche Entfernung zwischen dem Iod-Atom und den beiden Nachbarbasen (je 0,35 nm) [96] kleiner als der Abstand zwischen Iod und Desoxyribose (>0,5 nm).

Die Bildung von Fragmentationsprodukten aus dem Zucker dürfte auf einen oder mehrere der anderen Folgeprozesse des Auger-Effekts zurückzuführen sein, d.h. auf Schäden durch Auger-Elektronen, angeregte Lösungsmittelmoleküle oder Reaktionen mit Radikalen. Die Annahme, daß es sich bei der Fragmentierung der Base und des Zuckers um die Folgen zweier verschiedener Mechanismen handelt, wird durch den beobachteten Lösungsmittelleffekt unterstützt. Das unterschiedliche Ausmaß der Schädigung von Base und Zuckerrest in NaCl- und Phosphatpuffer-Lösung deutet darauf hin, daß Phosphationen die Zuckermoleküle vor vollständiger Fragmentierung schützen können, während sie auf die Zerstörung der Base keinen Einfluß haben. Wie ist dieser unterschiedliche Effekt zu erklären? Phosphationen reagieren mit solvatisierten Elektronen [97] und OH-Radikalen [98]

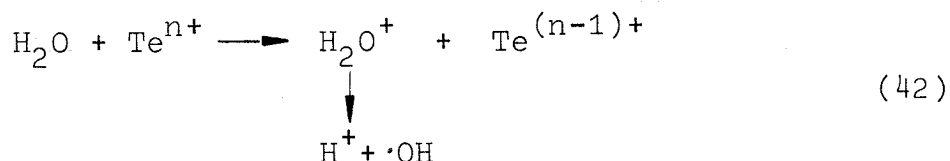


unter Bildung von H-Atomen bzw. Hydrogenphosphatradikalen. Erstere reagieren bevorzugt mit DNA-Basen, letztere mit Basen und Zuckerrest gleichermaßen ($K \sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten dieser Reaktionen sind um etwa eine Zehnerpotenz kleiner als die der OH-Radikale (vgl. Tab. 2, Abschnitt 2.3.). Diese sind in der Hauptsache für Schäden

am Zuckerrest verantwortlich [40]. Die Reaktionen (40) und (41) sind sogar um zwei Zehnerpotenzen langsamer als Reaktionen der OH-Radikale. Dennoch sollten sie für die Gesamtkinetik der Radiolyse von Bedeutung sein.

Der bei den Untersuchungen verwendete Phosphatpuffer war 10 mM, d.h. pro ml Lösung waren 10^{-5} mol H_2PO_4^- -Ionen vorhanden. Andererseits enthielt jeder Milliliter Probenlösung nur 10^{-7} - 10^{-6} mol Desoxyribose (gebunden in 10-100 pmol pBR 322 DNA) und davon waren nur etwa 0,02 % ^{14}C -markiert. Die im Überschuß vorhandenen Phosphationen sollten deshalb eine echte Konkurrenz zum Substrat Desoxyribose darstellen und damit zu einer Verminderung der Radiolyseschäden am Zucker führen.

Als Folge des Auger-Effektes spielt gerade die Konzentration der OH-Radikale eine besondere Rolle. Sie wird durch Elektronenübertragungsreaktionen bei der Ladungsneutralisation



gegenüber der Primärradikal-Ausbeute durch Auger-Elektronen einseitig erhöht.

4.2.1.2. Elektronenmikroskopie

Die DNA jeder einzelnen Probe wurde nach Gaschromatographie und Analyse der nicht-flüchtigen niedermolekularen Fragmente für die Elektronenmikroskopie präpariert (vgl. Abschnitt 3.13.3.). Dazu wurden von jeweils 2 Präparaten einer Probe je 10 Aufnahmen aus verschiedenen Präparate-Bereichen gemacht. Abzüge von den Negativen wurden von einer größeren Anzahl verschiedener Proben gemeinsam bei der gleichen Einstellung des Vergrößerungsgerätes gemacht. Die Durchführung der elektronischen Längenmessung wurde, wie in Abschnitt 3.13.4. beschrieben, durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit der Methode war folgen-

dermaßen überprüft worden: Einzelne Bildausschnitte der Präparate wurden mehrfach photographiert, wobei der Elektronenstrahl zwischen den einzelnen Aufnahmen jeweils abgeschaltet und dann wieder neu eingestellt und justiert wurde. Es wurden Aufnahmen von verschiedenen Präparaten der gleichen Probe ausgemessen. Die Reproduzierbarkeit der photographischen Vergrößerung wurde dadurch überprüft, daß die Negative der Aufnahmen mehrmals im gleichen Maßstab vergrößert wurden. Bei diesem letzten Schritt lag die Standardabweichung nach 5 Versuchen bei $\pm 5 \%$. Für die anderen beiden Versuchsreihen betrug die Variation jeweils $\pm 3 \%$.

Abb. 21 zeigt die Längenverteilung von Sal I-gespaltener pBR 322-DNA vor und kurz nach dem Einbau von doppeltmarkiertem $[U-^{14}C, 5-^{125}I]IdCTP$. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von der inaktiven Plasmid-DNA wurden 2 Tage vor Beginn der Doppelmarkierung gemacht und dienten zusammen mit der elektrophoretischen Analyse als Nachweis für die Unversehrtheit und Reinheit der DNA. Die Präparation der doppeltmarkierten DNA, die als Standard für den Zeitpunkt t_0 dienen sollte, erfolgte erst 3 Tage nach der DNA-Polymerase-Reaktion. Der Grund dafür lag im Zeitablauf der durchgeführten Experimente. Die verschiedenen Reinigungsschritte, die nach der DNA-Polymerasereaktion durchgeführt wurden, um Proteine, überschüssige Nukleotide, Pufferkomponenten und andere Kontaminationen der doppeltmarkierten DNA quantitativ zu entfernen und die sorgfältige Vorbereitung der Ampullen für die fertigen Einzelproben erforderten eine Aufarbeitungszeit von 2 Tagen.

Gegenüber der inaktiven Plasmid-DNA mit ihrem einheitlichen Molekulargewicht treten in der doppeltmarkierten DNA bereits stärkere Schäden auf. Diese dürfen zumindest teilweise auf Radiolyseeffekte zurückgeführt werden, da die Reaktionslösung während der DNA-Polymerase-Reaktion für ca. 7 h der Strahlung von 40 mCi $[U-^{14}C, 5-^{125}I]IdCTP$ ausgesetzt war und eine Dosis von 1,1 krad absorbiert hat. Inwieweit Transmutationseffekte schon hier für das Fragmentationsmuster eine Rolle gespielt

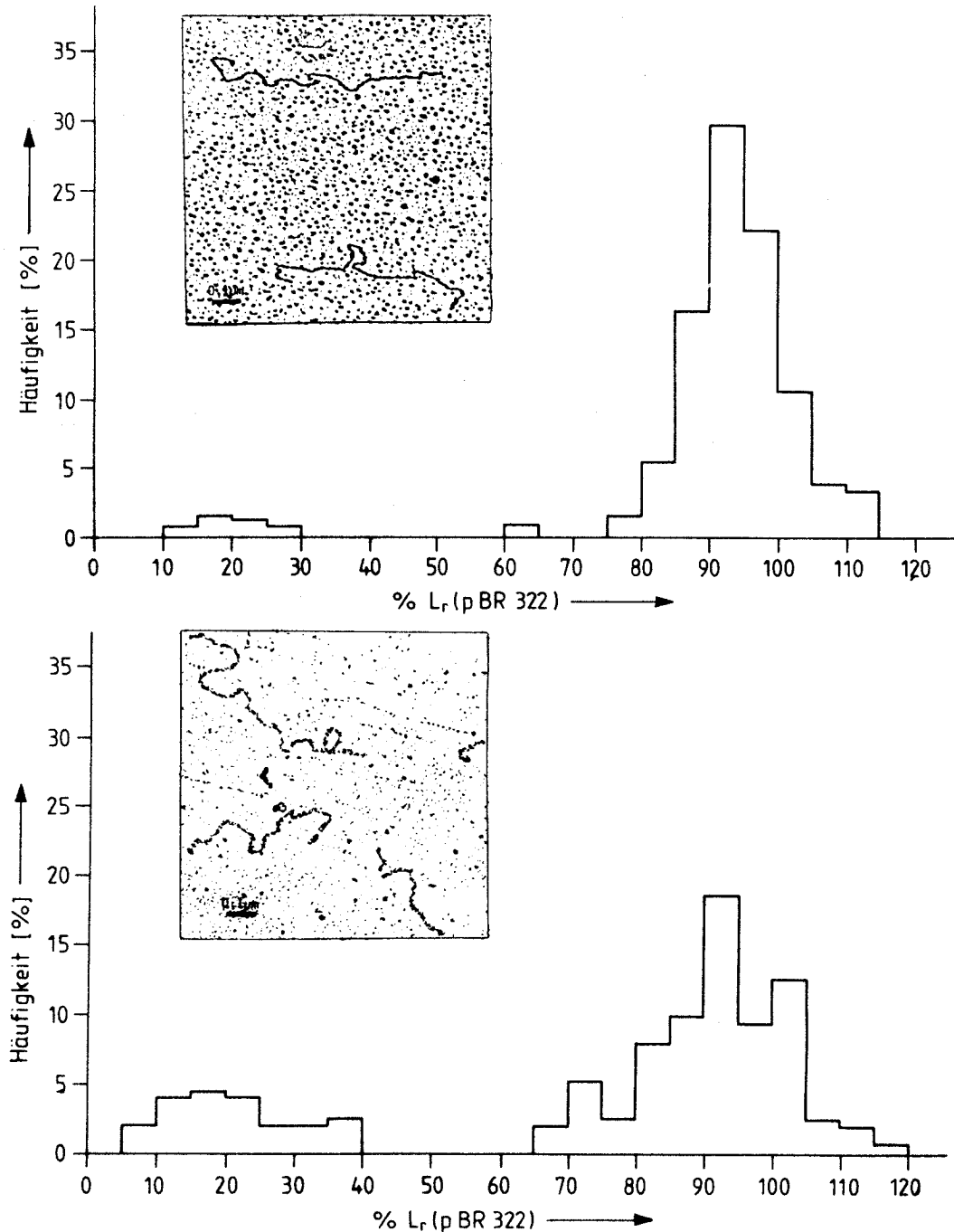


Abb. 21: Längenverteilung linearer pBR 322-Moleküle vor und kurz nach (t_0) der Doppelmarkierung mit $[U-^{14}C, 5-^{125}I]IdCTP$. Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit einzelner Fragmentgrößen, ausgedrückt in % der rechnerischen Gesamt-Länge L_r des Plasmids (s. Abschnitt 3.13.4.). Die Bildeinschübe oben links zeigen jeweils einen Ausschnitt aus einer dazugehörigen EM-Aufnahme.

haben könnten, soll weiter unten diskutiert werden.

In den Abb. 22 und 23 ist anhand von 4 Beispielen das unterschiedliche Ausmaß der DNA-Schädigung nach Zerfall von eingebautem Iod-125 gezeigt, wie es sich für die vier untersuchten Lösungsmittelsysteme nach etwa 5-monatiger Lagerung darstellt.

Einmal zeigen die Graphiken, daß im Vergleich zur Radiolyse (s. Abschnitt 4.1., Abb. 17) eine wesentlich stärkere Fragmentation der DNA-Moleküle stattgefunden hat. Zum andern ergibt sich für die NaCl-haltigen Systeme I und II eine wesentlich höhere Zahl von Doppelstrangbrüchen pro DNA-Molekül als für die Phosphatpuffersysteme III und IV.

In NaCl-Lösung sind praktisch keine unbeschädigten DNA-Moleküle mehr übrig. Jeder Zerfall hat zu mehreren Brüchen geführt, die das Plasmid in lauter kleine Stücke teilen. In Phosphatpuffer geht die Schädigung nicht soweit. Hier ist noch ein größerer Anteil DNA-Moleküle nicht oder nur wenig geschädigt. Offensichtlich spielt die Anwesenheit von Phosphationen nicht nur für das Ausmaß der lokalen Schäden am markierten Nukleotid eine wichtige Rolle, sondern auch für die Strangbruchhäufigkeit und das Fragmentmuster. Die Wirkung der Phosphationen wurde auf ihre Radikalfängereigenschaften zurückgeführt, speziell auf ihre Reaktion mit OH-Radikalen (vgl. Abschnitt 4.2.1.1.). Diese Reaktion wird um so wahrscheinlicher, je weniger konkurrierende Substratspezies vorhanden sind, z.B. dann, wenn sich ein OH-Radikal vom DNA-Strang entfernt. Es trifft dann zunächst nur auf Phosphationen mit denen es reagieren kann, bevor es einen anderen Strangabschnitt erreicht. Im NaCl-System dagegen sollte es für das OH-Radikal eher möglich sein, auch mit einem entfernten Nukleotid zu reagieren, weil es durch die Chloridionen nicht abgefangen wird. Das könnte erklären, weshalb die Strangbrüche in Phosphatpuffer mehr auf die Nachbarregion der Markierung beschränkt sind, während in NaCl-Lösung auch weiter entfernte Bereich des DNA-Moleküls getroffen werden.

Man sollte die Entstehung von Doppelstrangbrüchen nicht allein auf Radikalreaktionen zurückführen, sondern darin eher einen

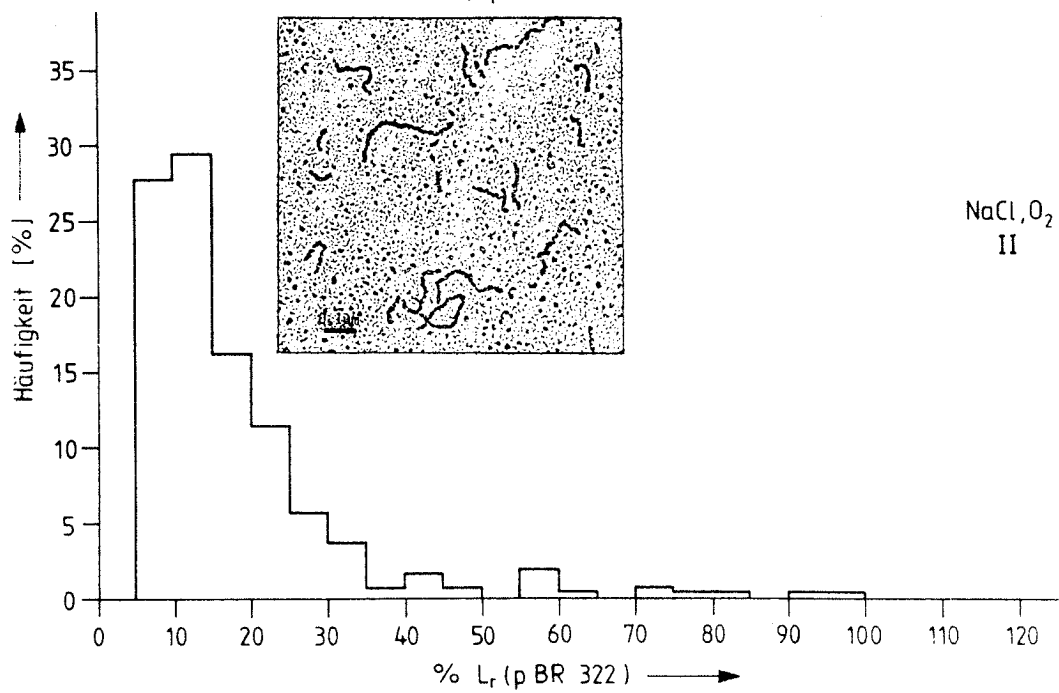
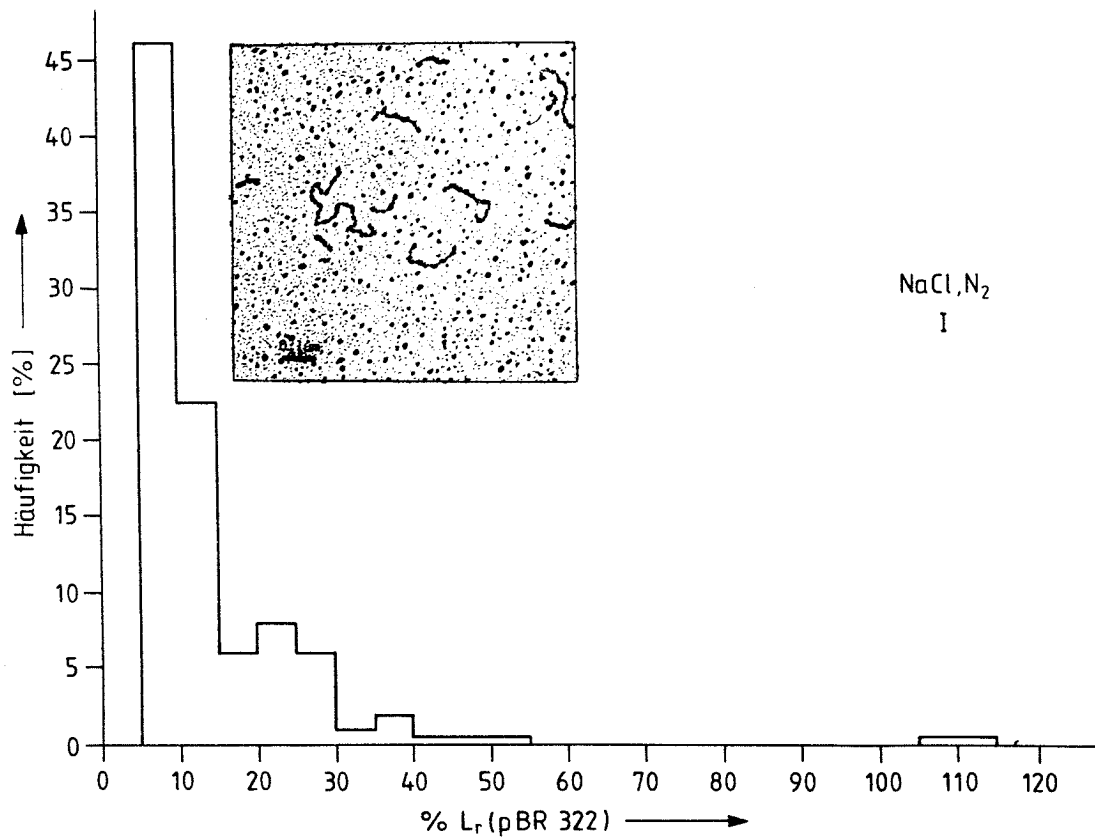
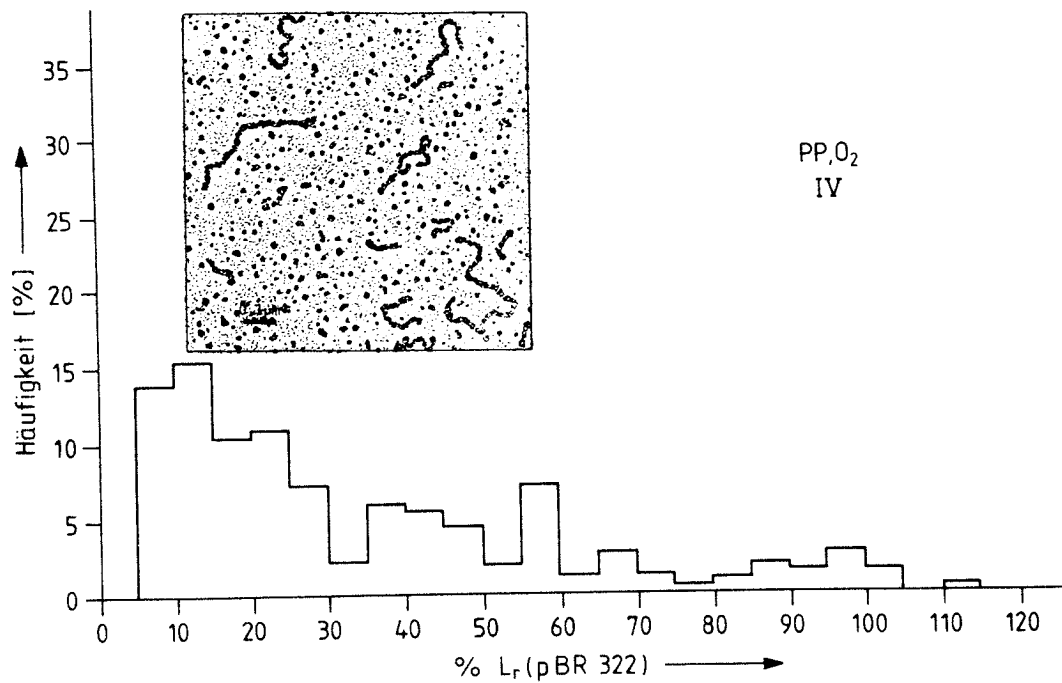
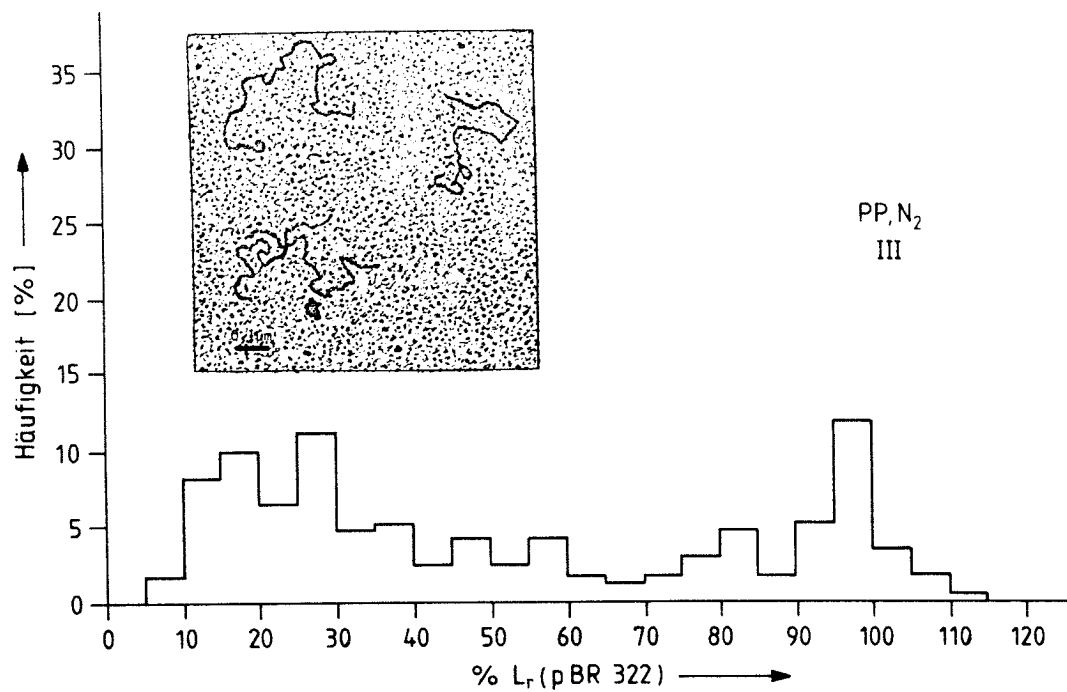


Abb. 22 und 23: Längenverteilung der DNA-Fragmente nach Zerfall von kovalent gebundenem Iod-125. Abgebildet ist jeweils ein typisches Verteilungsmuster, wie es für die verschiedenen Systeme beobachtet wurde.



Verstärkungseffekt sehen, durch den latente Strangschäden sichtbar werden. Zu dieser Art Schädigung muß man vor allem Veränderungen an der Base rechnen. Diese führen nicht notwendigerweise zu einem Strangbruch [40,48], eine Tatsache, die man sich z.B. bei der Sequenzierung von DNA direkt zunutze macht [99].

Wie lassen sich solche Schäden aber mit dem Zerfall von Iod-125 in Verbindung bringen? Schon im Zusammenhang mit der mechanistischen Behandlung der lokalen DNA-Schädigung, d.h. der Zerstörung des Desoxycytidinrests, der die Iod-Markierung trägt, wurde darauf hingewiesen, daß innerhalb der DNA-Kette Elektronentransfer über das gemeinsame π -Elektronensystem der Nukleobasen möglich ist. Anregungsenergie, die nach dem Zerfall von Iod-125 infolge Aufladung und Ladungsneutralisation und durch angeregte Spezies auf den DNA-Strang übertragen wird, muß keineswegs gleichförmig auf alle Basen verteilt werden.

Thymin kann als "Senke" für Anregungsenergie wirken, d.h. es kann ganz spezifisch Energie aufnehmen, die an anderer Stelle auf den DNA-Strang übertragen wurde [95]. Eine größere Anzahl benachbarter Thymin-Basen kann diesen Effekt noch verstärken und zur vermehrten Bildung angeregter und ionisierter Spezies führen. Dies wiederum könnte Ursache für eine erhöhte Strangbruchhäufigkeit oder zumindest -Empfindlichkeit sein. In derartig (vor-)geschädigten DNA-Abschnitten können durch zusätzlichen Radikalangriff bevorzugt Strangbrüche erfolgen.

Wie die ungleiche Verteilung der Fragmentgröße zeigt, ist die Häufigkeit der Strangbrüche offensichtlich auch nicht für alle Molekülbereiche gleich groß. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Richtigkeit dieser Aussage noch quantitativ bewiesen. Zunächst soll untersucht werden, ob die Größe der beobachteten DNA-Fragmente durch Besonderheiten in der DNA-Sequenz, z.B. durch besonders T-reiche Regionen, erklärbar ist.

Eine genaue Analyse der pBR 322-Sequenz zeigt, daß insgesamt 12 T-reiche Zentren auftreten, in denen vier und mehr Thymin-Basen direkt benachbart sind. Ihre Verteilung innerhalb der DNA ist unsymmetrisch zur Sal I-Schnittstelle (Abb. 24).

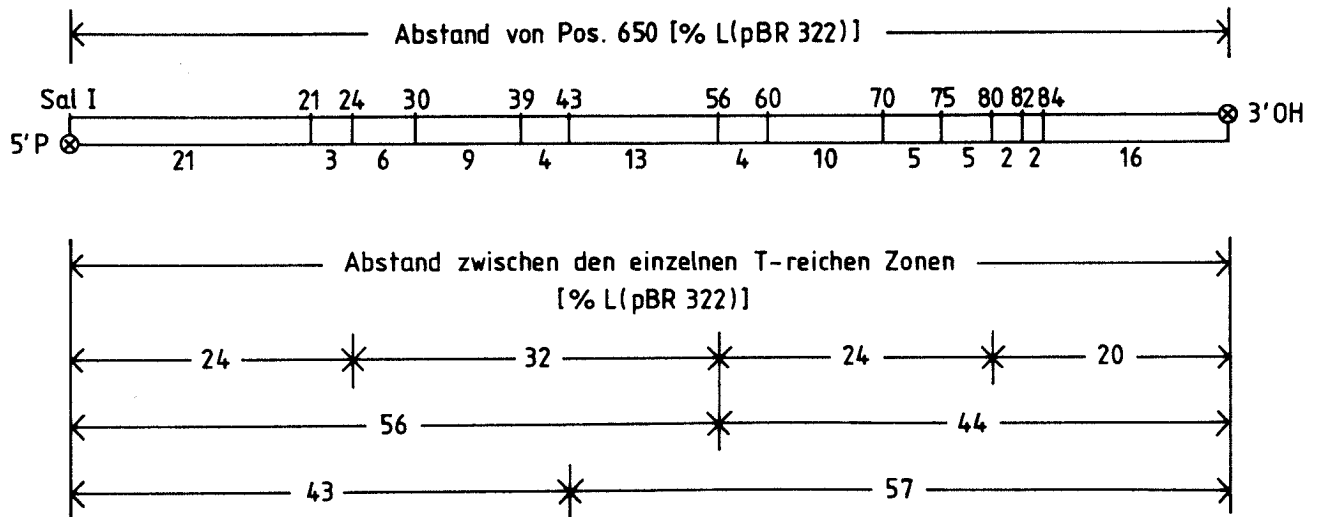


Abb. 24: Verteilung T-reicher Regionen innerhalb des Plasmids pBR 322 bezogen auf die Position der Sal I-Schnittstelle.

Der Abstand zwischen den einzelnen Bereichen und ihre Entfernung von der Iod-125-Markierung (= Sal I-Schnittstelle) entspricht Werten von 5 - 20 % der Gesamtlänge. Fragmente dieser Größe wurden im Fall starker Schädigung (Medium I und II) hauptsächlich beobachtet. DNA-Abschnitte mit Längen von 25 bis 40 % des Originals, wie sie bevorzugt in den Medien III und IV auftraten, lassen sich entsprechend durch Kombination aus zwei oder mehreren dieser Zonen konstruieren. Ob die Verteilung der T-reichen Zonen rein zufällig mit den beobachteten Fragmentgrößen übereinstimmt, ließe sich überprüfen, indem man pBR 322 an anderer Stelle markiert und so eine neue Beziehung zwischen Markierung und T-reichen Regionen schafft. Dann sollten je nach Entfernung der einzelnen Bereiche voneinander neue Verteilungsmuster entstehen. Bei Verwendung anderer, besonders T-reicher oder -armer DNA-Substrate sollten ebenfalls unterschiedliche Fragmentgrößen auftreten.

Wie im Falle der Entstehung der Fragmentationsprodukte CO und CO₂ ist auch die Konzentrationsabhängigkeit und damit gleichzeitig die Dosis- und Dosisleistungsabhängigkeit bei der Strangbruchhäufigkeit noch nicht ganz geklärt. Das einfache Modell: höhere DNA Konzentration → höhere Knäuedichte → höhere Strangbruchhäufigkeit versagt weitgehend. Die meisten Doppelstrangbrüche findet man im allgemeinen im Konzentrationsbereich zwischen 20 und 50 µg/ml. Bei höherer und niedrigerer DNA-Konzentration nimmt das Ausmaß der Schädigung dann oft deutlich ab.

Wegen der geringen Zahl von Meßpunkten und der damit verbundenen Einschränkung der Aussagefähigkeit muß auch hier auf eine detaillierte Diskussion dieses Phänomens verzichtet werden. Die im Zusammenhang mit dem DNA-Konzentrationseffekt bei der Gasausbeute erwähnten Einflüsse von Elektrolyten (vgl. Abschnitt 4.2.1.1.) auf das Lösungsverhalten und die Konformation der DNA sowie die Abhängigkeit der Radikalausbeute von der Zusammensetzung der Lösung können auch hier als rein qualitative Begründungen angewendet werden. Hier wie dort sind aber weitere systematische Untersuchungen erforderlich, um genauere Aussagen über den Verlauf der Konzentrationsabhängigkeit und seine möglichen Ursachen machen zu können.

Aus der Längenverteilung der DNA-Fragmente läßt sich die Strangbruchhäufigkeit ermitteln. In der Literatur sind bisher nur Mittelwerte angegeben, die sich aus dem Verhältnis des ursprünglichen Molekulargewichts (M_0) zum mittlerem Molekulargewicht nach der Schädigung ($\bar{M}_t$) ergeben. Es gilt für die mittlere Bruchzahl $\bar{B}$:

$$\bar{B} = \frac{M_0}{\bar{M}_t} - 1 \quad (43)$$

Solche Mittelwerte sagen aber nichts über die Häufigkeit bestimmter Fragmentgrößen aus. Wendet man Gl. (43) nacheinander auf einen immer größeren Anteil der vermessenen Moleküle an,

so erhält man eine Vielzahl von prozentualen Bruchzahlen B_x

$$B_x = \frac{M_0}{\bar{M}_x} - 1 \text{ mit } \bar{M}_x = \frac{\sum_{i=1}^{i \leq k} n_i M_i}{(k)} \text{ und } X(k) = \sum_{i=1}^{i \leq k} n_i \quad (44)$$

M_i = Molekulargewicht der i-ten Fraktion

n_i = Wichtungsfaktor (% Häufigkeit der Fragmente mit dem Molekulargewicht M_i)

$X(k)$ = Prozentsatz der berücksichtigten Moleküle

k = Zahl der Molekulargewichtsfractionen (z.B. 20 Intervalle mit $\Delta M = 0.05$)

Der B_{100} -Wert, d.h. die Bruchzahl die sich bei Berücksichtigung der Gesamtheit der vermessenen DNA-Moleküle ergibt, ist dann mit der mittleren Bruchzahl $\bar{B}$ identisch.

Trägt man die jeweiligen prozentualen Bruchzahlen gegen den Anteil der vermessenen Moleküle ($X(k)$) auf, so erhält man eine Bruchhäufigkeitsverteilung. Aus der Form solcher Kurven läßt sich ablesen, ob die Verteilung der Strangbrüche statistisch erfolgt bzw. welche Fragmentgrößen im Fall nicht-statistischer Verteilung bevorzugt auftreten.

Anhand eines einfachen Beispiels soll dies kurz erläutert werden:

Eine DNA-Probe mit anfänglich einheitlichem Molekulargewicht M_0 soll nach der Schädigung ein mittleres Molekulargewicht von 50 % des ursprünglichen Werts haben bzw. im Mittel einen Strangbruch aufweisen, d.h. $\bar{M}_t = \frac{M_0}{2}$ und $\bar{B} = 1$. In Abb. 25 sind hierfür 3 extreme Fälle (1-3) aufgetragen, für die die angegebenen Mittelwerte gelten, deren Strangbruchmuster jedoch völlig unterschiedlich sind. Nur in einem Fall (1) werden Moleküle mit dem errechneten Molekulargewicht auch tatsächlich beobachtet, während in den anderen beiden Fällen (2 und 3) diese Fragmentgröße überhaupt nicht auftritt. Aus dem Kurvenverlauf (Steilheit, Krümmung etc.) der Bruchhäufigkeitsverteilung lassen sich diese Unterschiede in den Verteilungsmustern direkt ablesen.

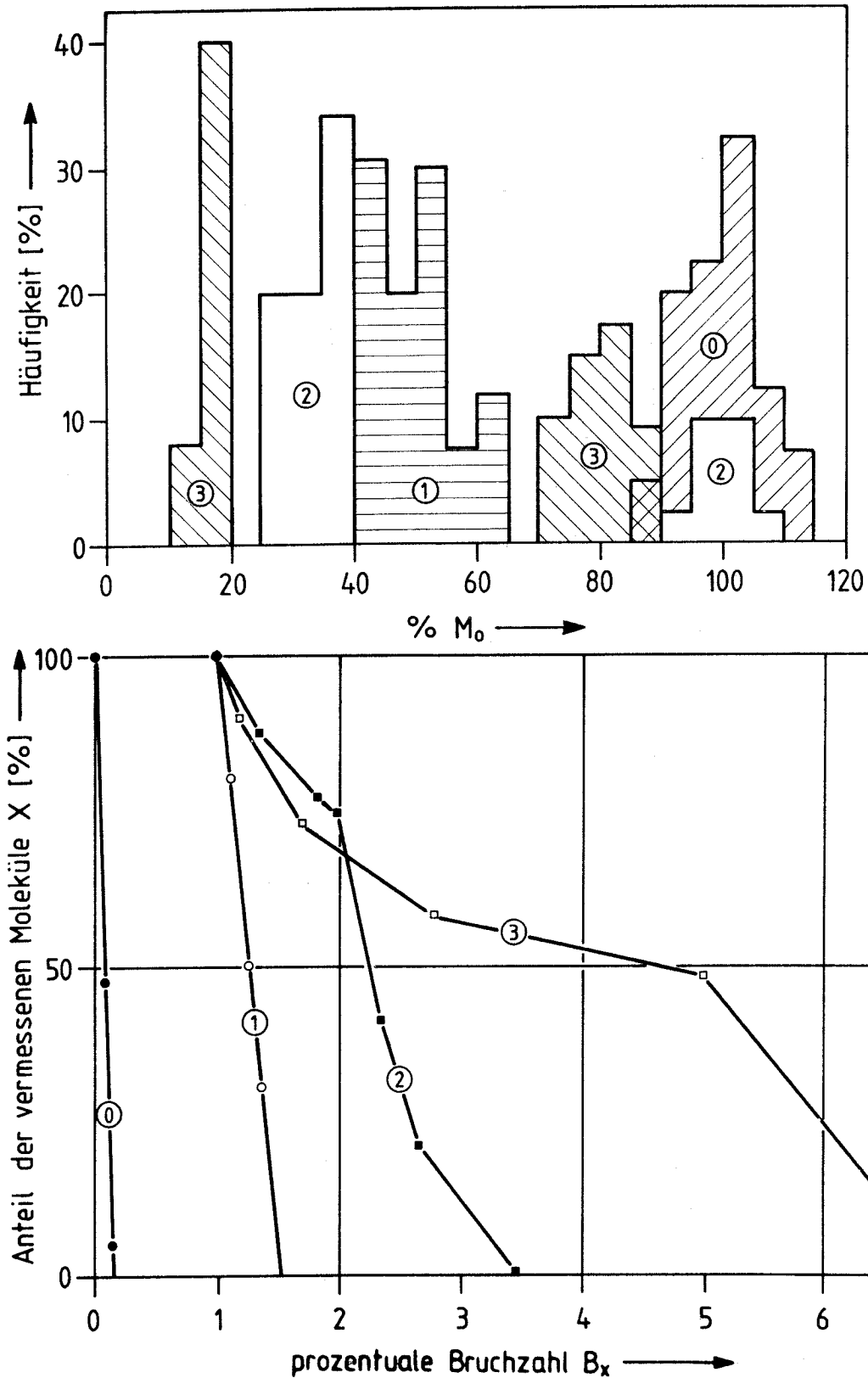


Abb. 25: Schematische Darstellung dreier verschiedener Fragmentmuster mit jeweils denselben Mittelwerten $\bar{M}_t = \frac{M_0}{2}$ und $\bar{B} = 1$.

○ (▨) repräsentiert die anfanglich ungeschädigte Molekülfraktion mit einheitlichem Molekulargewicht M_0 ,
1(▨), 2(□) und 3(▩) die Fraktionen mit den geschädigten Molekülen.

A) Längenverteilung der Fragmente / B) Bruchhäufigkeitsverteilung

In Abb. 26 sind einige extreme Beispiele für Bruchhäufigkeitsverteilungen aufgetragen, wie sie in NaCl- und Phosphatpuffer-Lösung nach Zerfall von integrierter Iod-125 beobachtet wurden. Es handelt sich dabei um die Daten der jeweils am stärksten bzw. am wenigsten geschädigten Proben in den genannten Medien. Zum Vergleich enthält die Graphik auch die entsprechenden Kurven für die inaktive Plasmid-DNA (ST); für die Schädigung zum Zeitpunkt t_0 und die Radiolyseergebnisse (R).

Der Kurvenverlauf für das Radiolyseexperiment mit der geringsten beobachteten Schädigung ($R_{\min}$) fällt praktisch mit der Kurve für die inaktive, ungeschädigte Plasmid-DNA zusammen ($B_{100} = \bar{B} < 0,1$, $B_{50} = 0,2$). Die am stärksten geschädigte Radiolyseprobe ($R_{\max}$) unterscheidet sich davon auch nicht allzu sehr ($\bar{B} = 0,4$, $B_{50} = 0,6$). Da die Verteilung der Strangbrüche, die auf radiolytische Effekte zurückgehen, statistisch ist, ist die Form der Bruchhäufigkeitskurven der Radiolyseexperimente charakteristisch für eine statistische Verteilung. Kurven, deren Gestalt von diesem Typ abweichen zeigen daher nicht-statistische Verteilung der Bruchhäufigkeiten an. Das ist offensichtlich für die anderen Kurven der Fall. Nach Zerfall von eingebautem Iod-125 treten also nicht-statistische Verteilungen der Strangbruchhäufigkeiten auf. Aus dem Verlauf der Kurven kann man weiter entnehmen, daß sich auch beim Übergang von Phosphatpuffer zu NaCl-Medium das Fragmentmuster ändert. Die Gestalt der Kurven geht von einer konkav-gekrümmten Form über eine S-Form in eine konvexe Krümmung über. Das bedeutet, daß in Phosphatpuffer neben kleinen Fragmenten immer auch eine mehr oder weniger große Zahl wenig oder gar nicht geschädigter Moleküle auftritt ($PP_{\max}$: $\bar{B} = 2,2$, $B_{50} = 6,6$). In NaCl dagegen liegt der Schwerpunkt eindeutig auf Seiten der kleinen Fragmente. ($NaCl_{\max}$: $\bar{B} = 5,0$, $B_{50} = 11,8$). Ungeschädigte DNA-Moleküle kommen praktisch nicht mehr vor. Auch die t_0 -Kurve ($\bar{B} = 0,4$, $B_{50} = 0,9$) der doppeltmarkierten DNA zeigt bereits Abweichungen von einer statistischen Verteilung der Strangbrüche. Der B_{100} -Wert bzw. die mittlere Bruchzahl $\bar{B}$ stimmt mit dem entsprechenden Wert der $R_{\max}$ -Kurve überein. Im weiteren Verlauf der Kurve treten aber stärkere Unterschiede zu den

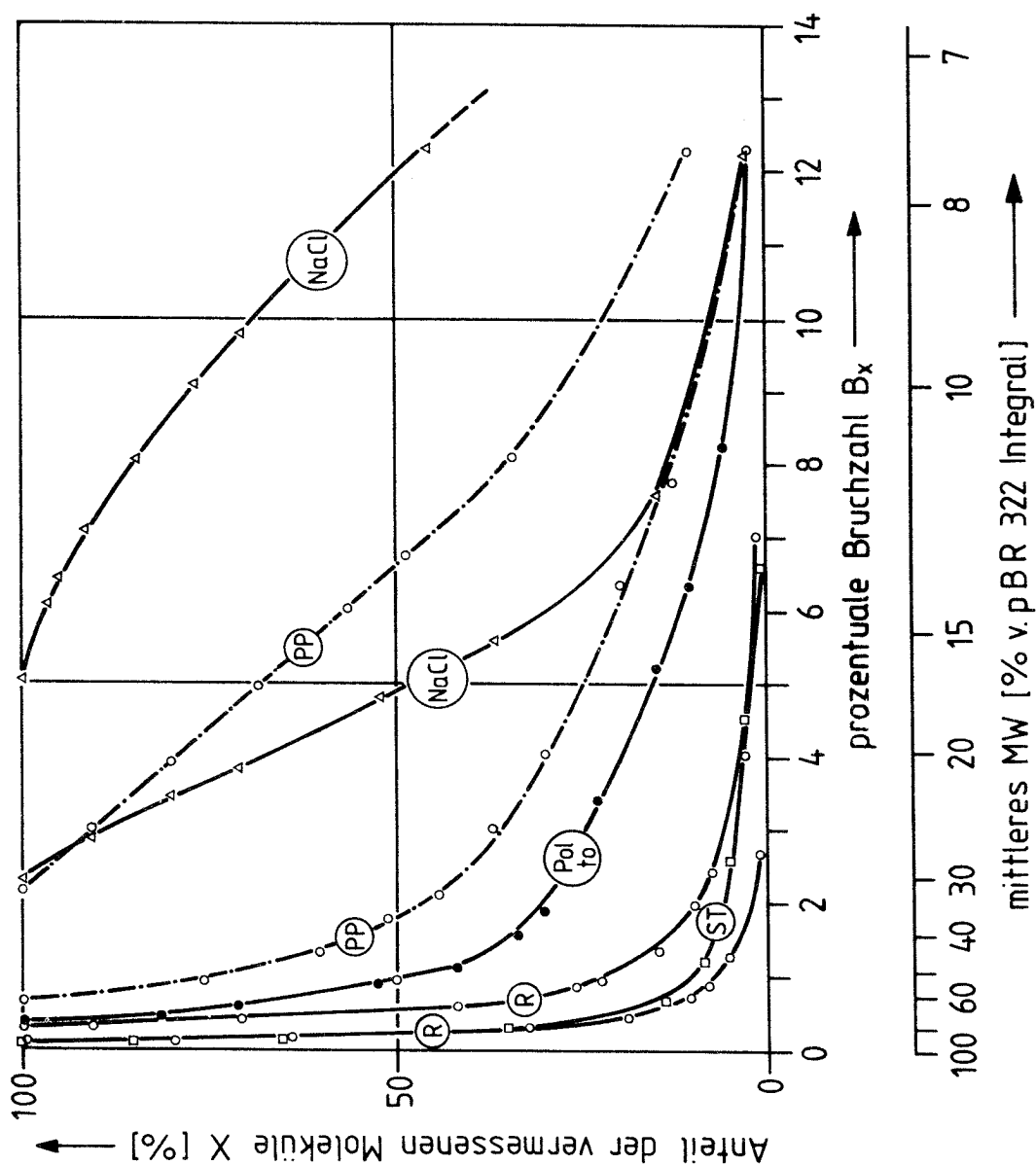


Abb. 26: Häufigkeitsverteilung der Strangbrüche nach Zerfall von Iod-125 in DNA (Extremwerte). minimale und maximale in NaCl-Lösung ($\Delta-\Delta-$) und Phosphatpuffer ($o-.-o$) beobachtete Schäden. ST($-\square-$) inaktive pBR 322 DNA (Standard); R($-o-$) Radiolyse; Pol t_0 ($-\bullet-$) doppelmarkierte DNA zum Zeitpunkt t_0 .

entsprechenden Radiolysewerten auf. Hier sind kleine DNA-Fragmente bezogen auf die Gesamtschädigung überrepräsentiert. Es scheinen sich also bereits nach 3 Tagen, in denen erst 5 % der eingebauten Iod-125-Atome zerfallen sind, die ersten Effekte der Iod-125-Transmutation abzuzeichnen.

Es sei noch erwähnt, daß die angegebenen Bruchzahlen Minimalwerte darstellen, weil ein Bruch direkt am Ort des zerfallenden Iodatoms die Molekülgröße nur um 3 Basen bzw. um weniger als 0,1 % (= $3/4362$ Basen) reduziert, was mit der hier angewendeten elektronenmikroskopischen Technik nicht nachzuweisen ist. Ein Doppelstrangbruch an dieser Stelle ist aber sehr wahrscheinlich. Wie die Analyse der ^{14}C -markierten Zerfallsprodukte nämlich gezeigt hat, ist keine Aktivität mehr in der DNA-Fraktion zu beobachten, d.h. daß am markierten Einzelstrang ein Bruch entstanden ist. Wegen der hohen lokalen Energiedeposition beim Zerfall des Iod-125 Atoms ist auch ein Bruch des gegenüber liegenden Strangs zu erwarten (vgl. hierzu auch nächsten Abschnitt).

Bisher wurden noch keine systematischen Untersuchungen zur Kinetik der Entstehung von Strangbrüchen nach Zerfall von kovalent gebundenem Iod-125 durchgeführt. Lediglich die nochmalige Untersuchung eines elektronenmikroskopischen Präparates von Probe t_0 ($c_{\text{DNA}} \sim 300 \mu\text{g/ml}$, 10 mM PP) lieferte einen ersten Hinweis auf ein rasches Fortschreiten der DNA-Schädigung. Dieses Präparat wurde 10 Tage nach dem Zeitpunkt t_0 hergestellt. Während dieser Zeit war die DNA-Probe bei 4°C unter Luftatmosphäre aufbewahrt worden. Sie zeigte gegenüber der ersten Untersuchung eine wesentlich stärkere Fragmentierung, die fast im Bereich der maximalen Strangbruchhäufigkeit lag, die in Phosphatpuffer nach 5-monatiger Lagerung beobachtet worden ist. Dies und die bereits zum Zeitpunkt t_0 beobachtete Schädigung sowie auch der schnelle Anstieg der CO- bzw. CO_2 -Ausbeuten mit der DNA-Konzentration bzw. Dosis (s. Abschnitt 4.2.1.1.) sprechen sehr stark für eine Art Sättigungseffekt, der schnell erreicht wird. Weitere Untersuchungen zu dieser Fragestellung sind jedoch notwendig, um den molekularen Mechanismus der Iod-125-zerfallsin-

duzierten Strangbrüche auch im Hinblick auf die Kinetik weiter aufzuklären.

Bisher wurde stets davon ausgegangen, daß pro Iod-125-Zerfall ein DNA-Doppelstrangbruch in unmittelbarer Nähe der Markierung auftritt [z.B. 16,34]. Martin und Haseltine [27] hatten diesen Bereich auf maximal 20 Basenpaare eingeschränkt. Die hier beschriebenen Experimente zeigen jedoch eindeutig, daß sich pro Iod-125-Zerfall mindestens ein Doppelstrangbruch ereignet, daß aber auch noch zusätzliche Brüche in Strangabschnitten erfolgen können, die bis zu 2000 BP vom Ort des Einbaus entfernt sind. Erklärungen für diese Widersprüche ergeben sich aus folgenden, in wesentlichen Punkten unterschiedlichen experimentellen Ansätzen:

Außer Martin und Haseltine hat keiner der früheren Autoren Iod-125 an definierter Stelle innerhalb eines DNA-Moleküls eingebaut. Damit war jedoch keinerlei Ortskorrelation möglich und Aussagen über Ort und Zahl der Strangbrüche rein hypothetisch. Martin und Haseltine benutzten nur kurze DNA-Fragmente mit einer Länge von 59 bzw. 121 BP. Solche DNA-Stücke verhalten sich aber wie starre Stäbchen [100]. Einflüsse der DNA-Tertiärstruktur auf das Ausmaß der Schädigung bleiben dabei unberücksichtigt. Sie verwendeten zwei komplexe Puffersysteme, die strahlenchemisch nur schwer zu charakterisieren sind. In einem Fall arbeiteten sie sogar mit einem halbfesten Gel. Unter solchen Bedingungen mit Komplexbildnern, Radikalfängern und eingeschränkter Diffusion ist eine Vielzahl konkurrierender Reaktionen denkbar, die sich auf die Reichweite der DNA-Schädigung auswirken können. Nicht zuletzt liefert eins der beiden von Martin und Haseltine beschriebenen Experimente keine widerspruchsfreien Resultate. Ein DNA-Fragment wurde am 3'-Ende mit ^{125}I -dC und am 5'-Ende des gleichen Einzelstrangs mit ^{32}P markiert. Nach 7-wöchiger Lagerung wurden die Zerfallsprodukte auf einem hochauflösenden Sequenzierungsgel getrennt und autoradiographisch nachgewiesen. Ungewöhnlich ist dabei, daß versucht wurde, mit einem kurzlebigen Nuklid (^{32}P , $t_{1/2} = 14 \text{ d}$) die Zerfallseffekte eines längerlebigen Nuklids (^{125}I , $t_{1/2} = 60 \text{ d}$) nachzuweisen. Nach 7 Wochen sind neben

57 % der anfänglichen Iod-125-Aktivität nur noch knapp 9 % der ^{32}P -Aktivität vorhanden. Eine Überlagerung von ^{125}I - und ^{32}P -Zerfallseffekten ist hierbei wahrscheinlich, zumal mit einer Nachweismethode wie der Autoradiographie, die kaum zwischen den Strahlungsarten der beiden Nuklide zu unterscheiden vermag.

4.2.2. Untersuchung an DNA-Proben mit Ligasebehandlung

Ein Teil der DNA wurde direkt im Anschluß an die Radioiodierung (DNA-Polymerase-Reaktion) mit T⁴-Ligase behandelt. Dieses Enzym kann völlig basengepaarte DNA-Stränge zu Ringen schließen oder zu linearen Oligomeren verknüpfen, wenn diese freie 3'-OH- und 5'-Phosphat-Enden haben [101].

Diese Untersuchungsreihe (im weiteren Verlauf als L⁺ bezeichnet, die ohne Ligasebehandlung als L⁻) wurde aus folgenden Gründen durchgeführt: Falls Doppelstrangbrüche, wie zu Beginn der Arbeit angenommen (vgl. auch [27]), nur in unmittelbarer Nachbarschaft der Iodmarkierung erfolgen, wäre diese Schädigung an den linearen DNA-Molekülen, die praktisch an den Strangenden markiert waren, elektronenmikroskopisch nicht nachzuweisen. Der Ringschluß ermöglicht aber auch den Nachweis eines einzigen Doppelstrangbruchs, weil sich der Übergang von der Ringform zum linearen Molekül leicht verfolgen läßt. Schließlich sollte geprüft werden, ob die veränderte Konfiguration der DNA-Moleküle (Ring gegenüber Fadenmolekül) und der Ort der Markierung (Strangende gegenüber Molekülinneres) Auswirkungen auf das Fragmentierungsmuster haben.

Die Ausbeute der Ligase-Reaktion und das Verhältnis von Ringen zu linearen Molekülen hängt stark von der DNA- und Enzymkonzentration sowie der Reaktionsdauer ab. Im Fall der doppeltmarkierten DNA wurde die Reaktion auf 5 h begrenzt, um die Zahl der Strahlenschäden und eventuelle Reparaturprozesse so gering wie möglich zu halten. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen (s. Abschnitt 3.8.3.) wurden 25 % Ringe und 11 % Dimere erhalten. Für die Untersuchungen der

Zerfallseffekte an Ligase-behandelter DNA wurden die gleichen Medien verwendet wie für die Experimente der L^- -Reihe. Die Versuche wurden aber nur bei 2 verschiedenen DNA-Konzentrationen durchgeführt (etwa 20 und 50 $\mu\text{g/ml}$). Die CO - und CO_2 -Ausbeuten, die man bei den einzelnen Konzentrationen beobachtet, sind bereits in den entsprechenden Diagrammen der L^- -Reihe (Abb. 19 und 20, Abschnitt 4.2.1.1.) mit aufgeführt (mit L^+ bezeichnete Punkte).

Tab. 6 zeigt an 4 Beispielen die Verteilung der ^{14}C -Gesamtaktivität in den verschiedenen untersuchten Systemen, wie sie sich nach Zerfall von Iod-125 in Ligase-behandelter DNA darstellt. Zusätzlich sind die Ausbeuten für entsprechende L^- -Experimente in die Tabelle mitaufgenommen (Klammerwerte). Ähnlich wie im Fall der L^- -Reihe wurden etwa 10-30 % der ^{14}C -Aktivität in Form von niedermolekularen, nicht-flüchtigen Produkten identifiziert, wobei, ebenfalls in beiden Fällen ähnlich, unter den Verbindungen mit Pyrimidinkomponente Uracilderivate überwiegen. Hier wie dort wurde keine ^{14}C -Aktivität in der hochmolekularen DNA-Fraktion gefunden. Die Ausbeute an CO_2 ist in der L^+ -Reihe in allen Medien etwa gleich hoch, im Gegensatz zu L^- , wo die Ausbeuten an diesem Gas bei Experimenten mit NaCl -Lösung als Medium wesentlich höher sind als bei solchen mit Phosphatpuffer. Demgegenüber entsteht CO sowohl in der L^- - als auch der L^+ -Reihe und nahezu unabhängig vom Medium in jeweils etwa gleicher Menge. Für alle 4 Systeme der L^+ -Reihe liegt die ^{14}C -Bilanz bei etwa 50-60 %. Anteile von 40-50 % nicht-identifizierten Produkten wurden bei L^- -Experimenten nur in den Systemen III und IV beobachtet. Offensichtlich verhalten sich alle Ligase-behandelten DNA-Proben, auch die in NaCl -Medium, wie die unbehandelten in Phosphatpuffer.

Bevor auf die möglichen Ursachen dieser unterschiedlichen Ergebnisse eingegangen wird, sollen zuvor noch die Resultate der elektronenmikroskopischen Auswertung der L^+ -Experimente beschrieben werden.

Tab. 6: Produktverteilung nach dem Zerfall von ^{125}I in doppelt-markierter DNA mit Ligasebehandlung für verschiedene wässrige Medien. Die DNA-Konzentration beträgt jeweils etwa 20 µg/ml.

System	% - Anteil an Gesamt- ^{14}C -Aktivität			
	NaCl, N ₂	NaCl, O ₂	PP, N ₂	PP, O ₂
Produkt	I	II	III	IV
I. flüchtig				
CO ₂	24 (50)**	33 (72)	26 (10)	21 (23)
CO	11 (8)	12 (12)	11 (9)	10 (10)
C ₂ H ₆	2 (2)	2 (1)	2 (2)	1 (1)
II. nicht-flüchtig				
Cytosin	- (2)	- (-)	- (-)	- (-)
Uracil	3 (6)	2 (1)	4 (5)	3 (3)
Desoxycytidin	1 (1)	- (-)	2 (-)	1 (-)
Desoxyuridin	2 (2)	1 (3)	4 (6)	7 (<1)
Desoxycytidinmonophosphat	<1 (2)	3 (1)	1 (-)	- (<1)
Desoxyuridinmonophosphat	2 (7)	3 (3)	7 (10)	10 (2)
Isobarbitursäure/ 5-Hydroxyhydantoin	5 (7)	- (1)	2 (4)	- (-)
Formylharnstoff	- (3)	- (-)	- (-)	- (1)
III. hochmolekulare Fraktion				
^{14}C -Bilanz	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
	51 (90)	56 (94)	59 (46)	53 (42)

** In Klammern sind zum Vergleich Werte für entsprechende L⁻-Experimente angegeben.

Fehlergrenzen s. Tab. 5, Abschnitt 4.2.1.1.

Wie schon erwähnt lag die Ausbeute der T⁴-Ligase-Reaktion bei 25 % Ringen und 11 % linearen Dimeren. Bei den Ringen konnte man 2 Typen unterscheiden: Ringe mit mehr oder weniger Originallänge ($> 75 \% L_r$ (pBR 322) und solche die deutlich kleiner waren [Abb. 27]. Diese kleinen Ringe sollten aus DNA-Fragmenten entstanden sein, die durch Strahlenschädigung während der DNA-Polymerase-Reaktion gebildet wurden.

Die Längenverteilung der DNA-Moleküle kurz nach Ligasebehandlung ($= t_0$) wurde gleichzeitig mit der entsprechenden Untersuchung der L⁻-Probe durchgeführt (s. Abb. 21), d.h. 2 Tage nach der Ligase-Reaktion. Ein Vergleich der Abbildungen 21 (t_0) und 27 zeigt, daß die L⁺-Probe zu diesem Zeitpunkt bereits stärker geschädigt ist ($\sim 40 \%$ kurze Fragmente) als die L⁻-Probe ($\sim 25 \%$ kurze Fragmente). Trotz dieser stärkeren Grundschädigung bei t_0 findet man bei den 4-6 Monate lang gelagerten Einzelproben in keinem Fall eine so starke Fragmentierung wie bei den L⁻-Proben in NaCl-Lösung. Die Abbildungen 28 und 29 zeigen an jeweils einem Beispiel typische Längenverteilungsdiagramme für L⁺-Proben in den Medien I-IV. Danach sehen die Fragmentierungsmuster der Phosphatpuffer-Systeme etwa gleich aus wie in vergleichbaren L⁻-Experimenten. Die Verteilung der Bruchstücke in NaCl-Lösung entspricht in etwa der stärker geschädigter Phosphatpuffer-Proben. Sie läßt sich keineswegs mit den extremen Verteilungen der entsprechenden L⁻-Proben vergleichen. Statt der anfänglichen 25 % Ringmoleküle findet man am Ende der Lagerung nur noch 1-4 %. Das Verhältnis von großen zu kleinen Ringen, das anfangs etwa 5:1 betrug, kehrt sich deutlich zugunsten der kleinen Ringe um. In den meisten Fällen beobachtet man 2-4 % kleine (Anfangswert: 4 %) gegenüber etwa 0,5 % großen Ringen. Das bestätigt einerseits, daß wirklich jeder Zerfall eines eingebauten Iod-125-Atoms zu mindestens einem Doppelstrangbruch führt und deutet andererseits darauf hin, daß es sich bei den kleinen Ringen um inaktive DNA-Fragmente handelt, die, wenn überhaupt, nur Radiolyseschäden erfahren.

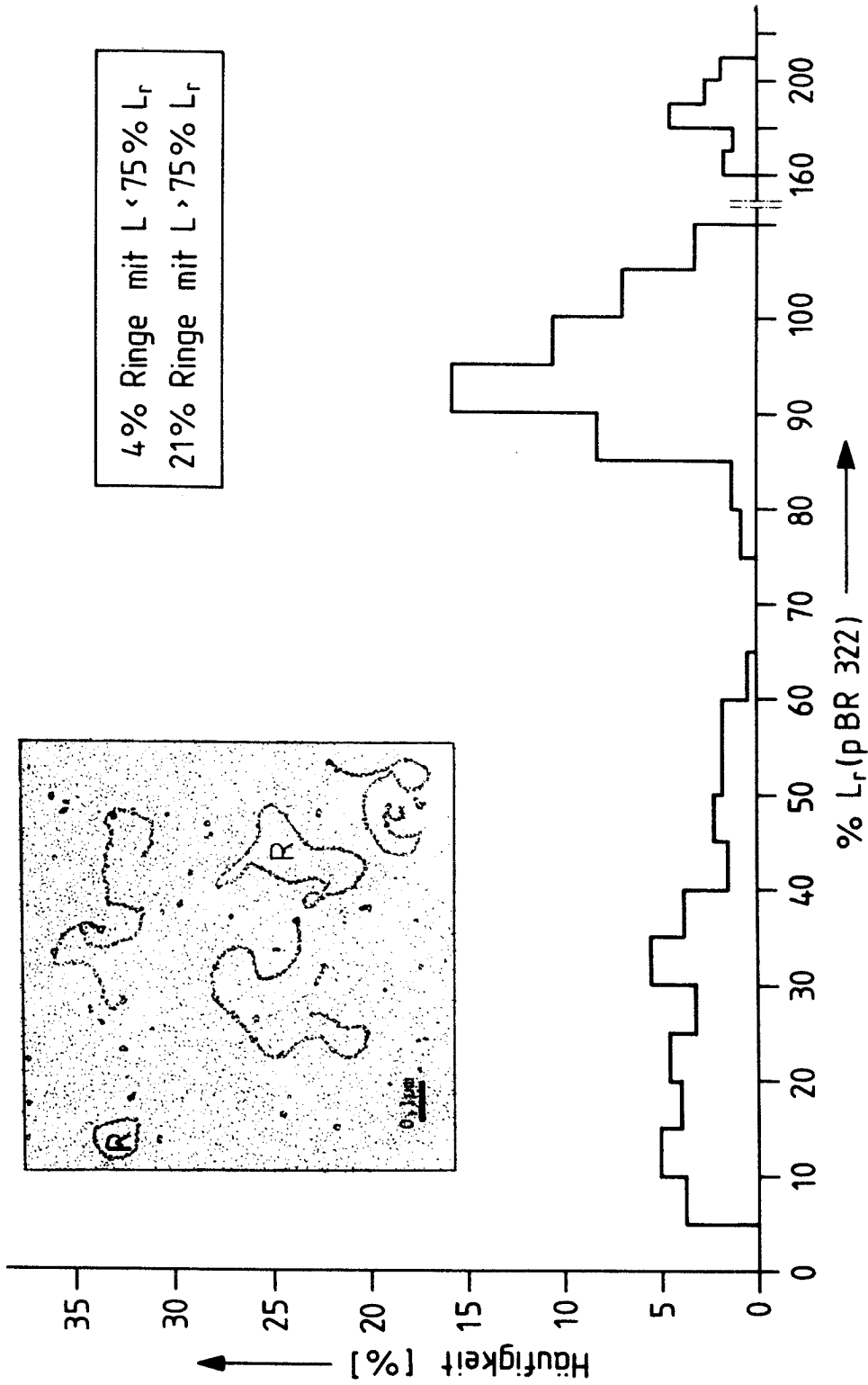


Abb. 27: Längenverteilung der Ligase-behandelten doppeltmarkierten DNA 2 Tage nach Reaktion (t_0). Dar- gestellt ist die prozentuale Häufigkeit einzelner Fragmentgrößen, ausgedrückt als % der rechnerischen Gesamtlänge L_r des Plasmids (s. Abschnitt 3.13.4.). Der Bildeinschub oben links zeigt einen Ausschnitt aus einer dazugehörigen EM-Aufnahme mit einem kleinen und einem großen Ringmolekül (R).

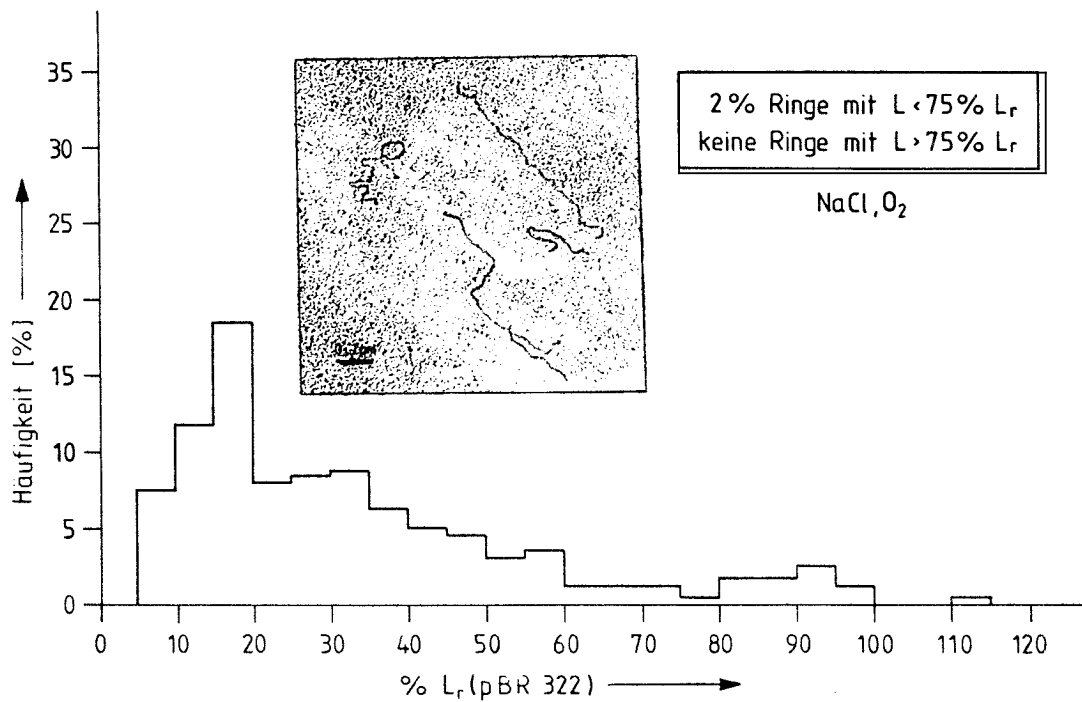
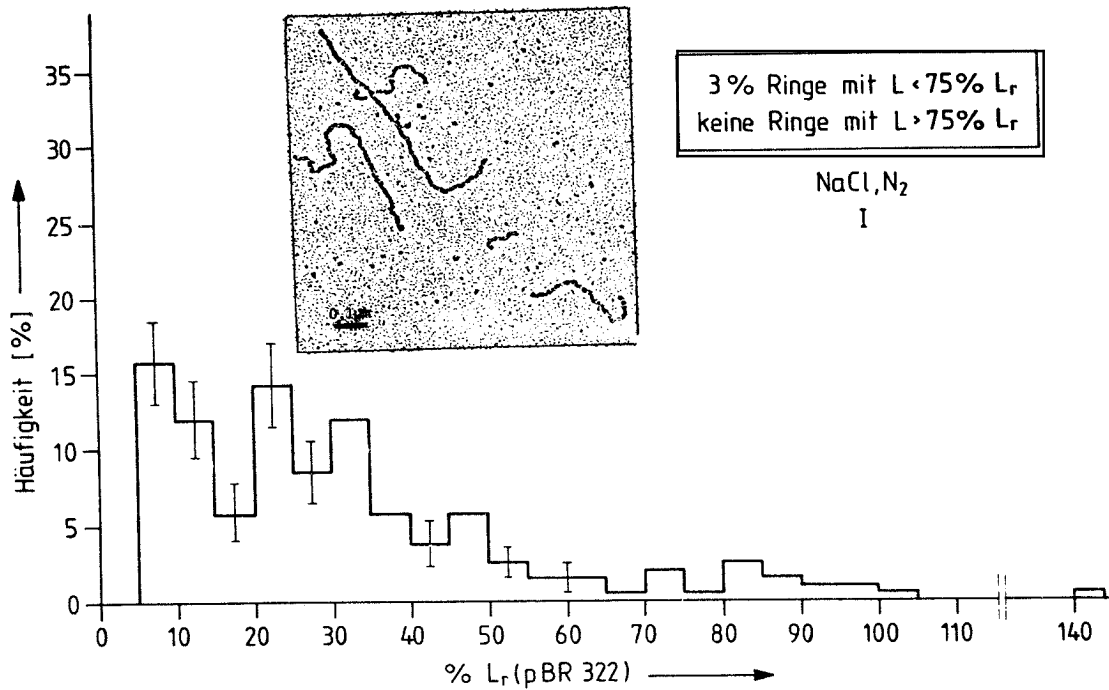


Abb. 28 und 29: Längenverteilung der Ligase-behandelten-doppelt-markierten pBR 322-DNA nach Zerfall von Iod-125 in den Medien I-IV. Für weitere Angaben s. Legende zu Abb. 27.

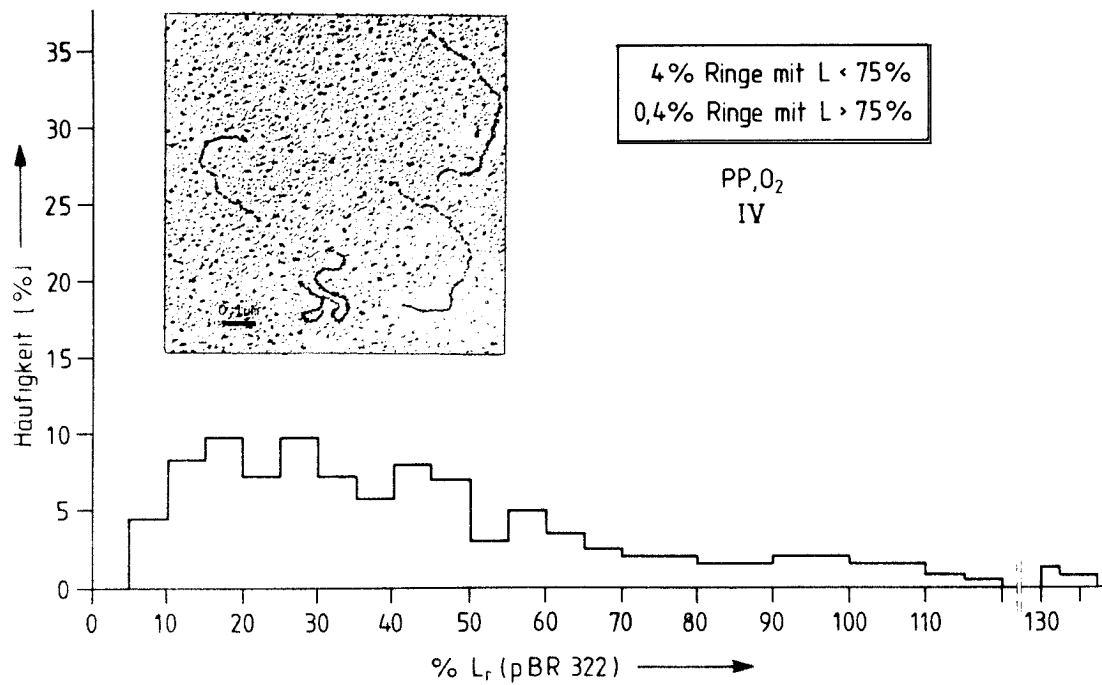
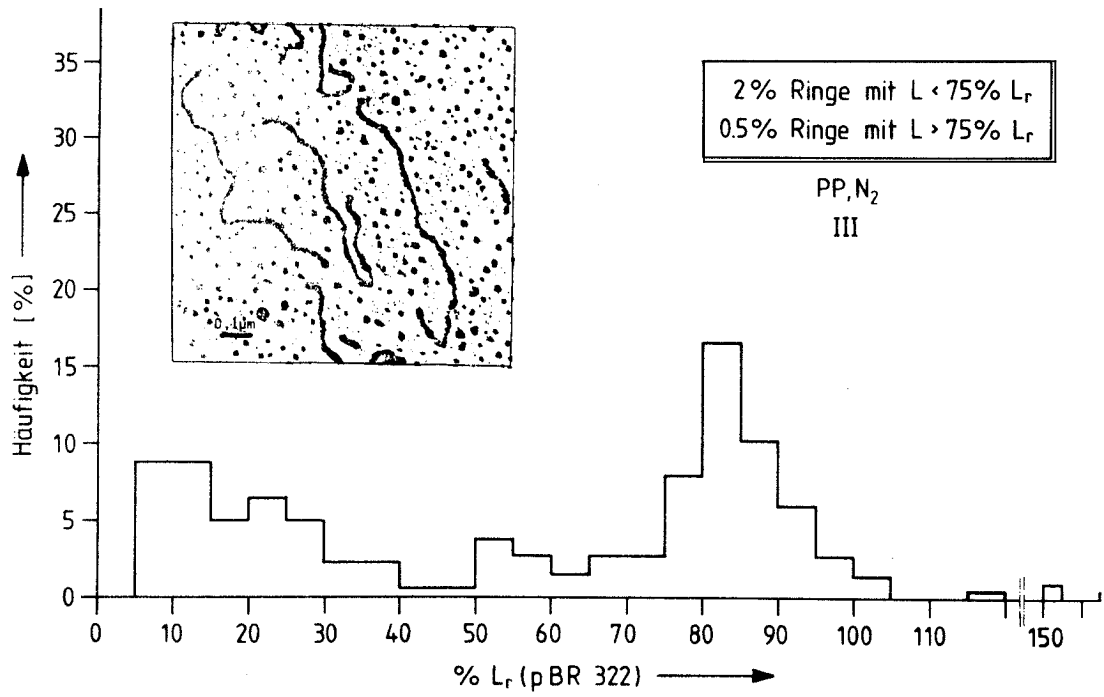


Abb. 30 zeigt die minimalen und maximalen Strangbruchhäufigkeitsverteilungen, die bei den Experimenten der L^+ -Reihe beobachtet wurden. Anders als bei der L^- -Reihe treten hier innerhalb des NaCl- oder Phosphatpuffer-Systems kaum größere Unterschiede im Ausmaß der Schädigung auf. Das gleiche gilt auch für den Vergleich beider Systeme miteinander. Der gesamte Bereich der beobachteten Strangbruchhäufigkeiten ist nur etwa halb so breit wie bei den entsprechenden L^- -Experimenten.

Das Diagramm zeigt zusätzlich die Bruchhäufigkeitskurven von inaktiver Plasmid-DNA (ST) und von der durch Radiolyse am stärksten geschädigten Ligase-behandelten DNA-Probe. Schließlich ist noch der Kurvenverlauf der zum Zeitpunkt t_0 nach der Ligasereaktion untersuchten DNA-Probe eingezeichnet.

Für die Radiolyse-geschädigte DNA ergibt sich wiederum eine statistische Verteilung der Bruchstücke (vgl. vorangegangenen Abschnitt). Der Verlauf der dazugehörigen Bruchhäufigkeitsverteilungskurve unterscheidet sich etwas von der entsprechenden Kurve einer nicht mit Ligase-behandelten DNA mit gleicher mittlerer Bruchzahl (B_{100}). Der Grund dafür ist die uneinheitliche Länge der Moleküle in Ligase-behandelter DNA mit Monomeren und Dimeren sowie die Anwesenheit ringförmiger DNA-Moleküle. Letztere z.B. verändern im Fall eines Doppelstrangbruchs ihre Größe nicht, bleiben also nach wie vor in der Fraktion der Moleküle mit Originallänge (= "ungeschädigt"). Bei der Prüfung der Frage, ob die Fragmentgrößen einer DNA-Probe statistisch verteilt sind, müssen diese Punkte berücksichtigt und die mathematischen Ausdrücke zur Berechnung des Anteils ungeschädigter Moleküle ($\bar{B}=0$) und der Molekülfraction mit einem Strangbruch ($\bar{B}=1$) entsprechend korrigiert werden.

Die Kurvenformen der doppeltmarkierten DNA-Proben einschließlich der t_0 -Probe zeigen wie schon im Fall der L^- -Reihe deutliche Abweichungen von statistischen Bruchhäufigkeitsverteilungen. Hier wie dort ist der Anteil ungeschädigter Moleküle niedriger als nach den Gesetzen der Statistik zu erwarten wäre.

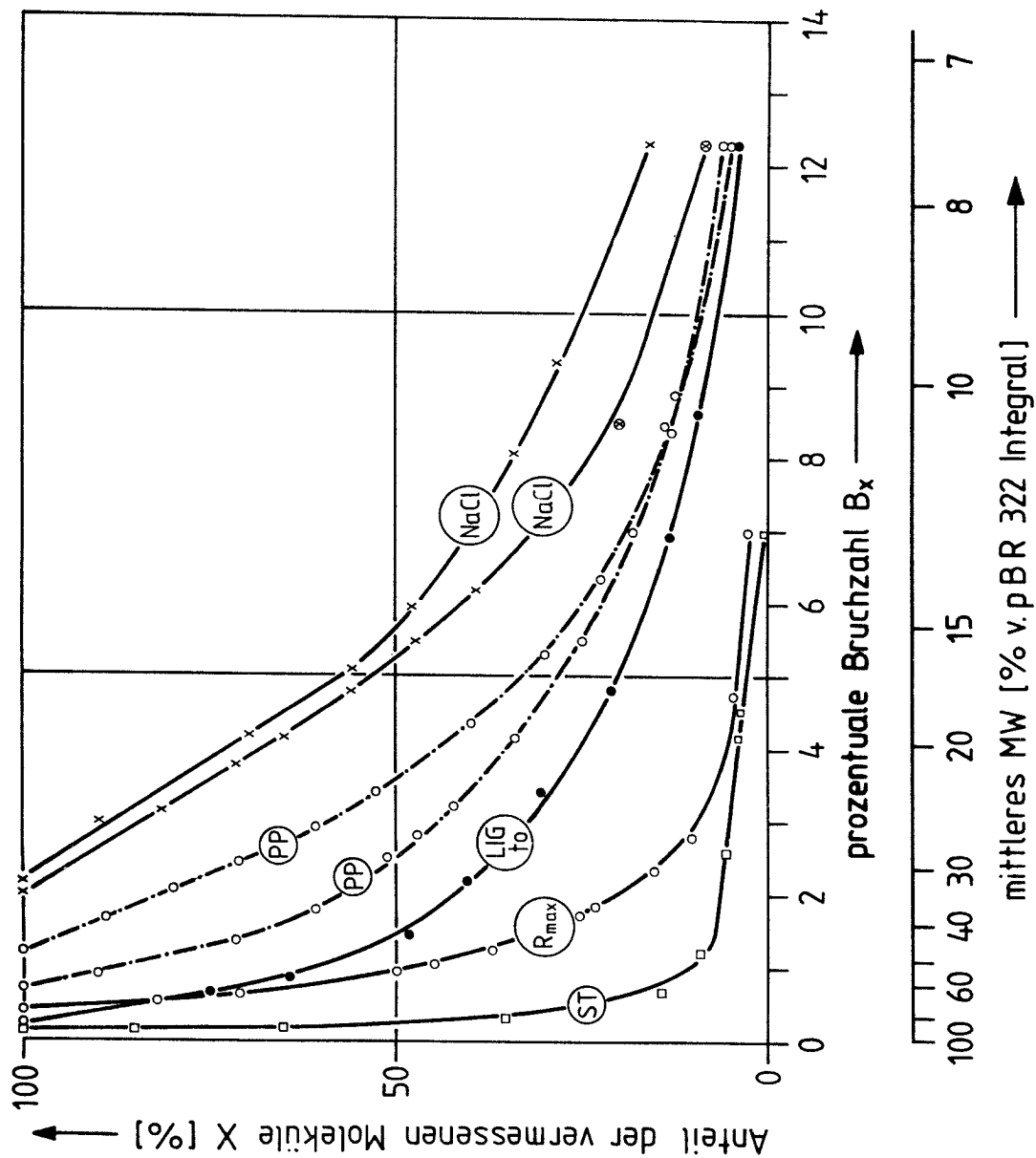


Abb. 30: Häufigkeitsverteilung der minimalen und maximalen Zahl von Strangbrüchen nach Zerfall von Iod-125 in Ligase-behandelter DNA -x- in NaCl-Lsg., --o in Phosphatpuffer. Lig t₀ (-o-) Ligasebehandelte, doppeltmarkierte DNA zum Zeitpunkt t₀; R (-o-) Radiolyse; -□- inaktive pBR 322 DNA (Standard)

Eine Erklärung der prinzipiellen Phänomene wie z.B. der Entstehung der gasförmigen Zerfallsprodukte und der Doppelstrangbrüche soll hier nicht wiederholt werden. Die Diskussion soll sich daher auf die Unterschiede zwischen Ligase-behandelter und unbehandelter DNA konzentrieren. Die Tatsache, daß quantitative Differenzen zwischen den Experimenten der L^- - und L^+ -Reihe auftreten, erscheint nicht weiter überraschend. Immerhin ist es nicht ungewöhnlich anzunehmen, daß es für die Art der Folgereaktionen eine Rolle spielt, ob sich der Molekülrest des zerfallenden Atoms fast am Ende eines Polymerstrangs (im hier behandelten Fall drittletztes Nukleotid vor 3'-Ende) oder irgendwo im Stranginneren befindet. Geometrie und Größe der Solvathülle können in beiden Fällen unterschiedlich sein. Die jeweilige elektronische Umgebung und sterische Anordnung müssen nicht übereinstimmen und somit müssen die Folgereaktionen eines bestimmten Primärprozesses nicht notwendigerweise identisch sein. In den zum Ring geschlossenen DNA-Molekülen ist das markierte Nukleotid auf beiden Seiten gleichermaßen von anderen basengepaarten Nukleotiden umgeben und hat minimalen Kontakt zu den Lösungsmittelmolekülen. Ähnliches gilt auch für 2 der 4 iodierten Nukleotide im dimeren DNA-Molekül. Die Ioddesoxycytidinreste im Molekülinnern haben eine mehr oder weniger homogene Umgebung. Anders ist die Situation der markierten Bausteine am Molekülende. Sie sind zwar ebenfalls Teil eines basengepaarten Doppelstrangs haben aber auch gleichzeitig leichten Kontakt zum umgebenden Medium, da die Helixstruktur im Bereich des Strangendes durch permeierende Wassermoleküle gelockert wird. Die markierten Nukleotide in L^- -DNA weisen ausschließlich solch eine Umgebung auf. Das unterschiedliche Ausmaß der Nukleotidschädigung in NaCl- und Phosphatpuffer-Lösung wird auf die konkurrierende Reaktion des Phosphat-Ions mit Primärradikalen der Wasserradiolyse zurückgeführt, durch die der Zuckerrest des Nukleotids vor vollständiger Oxidation geschützt wird. Bei den Experimenten der L^+ -Reihe findet man für beide Lösungsmittelsysteme etwa gleich starke Zerstörung, deren Ausmaß etwa dem der L^- -Experimente in Phosphatpuffer entspricht. Die gegenüber entsprechenden

L^- -Experimenten um etwa 50 % verminderte Schädigung bei Ligasebehandelter DNA in NaCl-Lösung ausschließlich durch Struktureffekte erklären zu wollen, erscheint gewagt, weil nur 32 % der markierten DNA-Moleküle als Dimere und Ringe vorlagen und damit eine veränderte Konfiguration bzw. Konformation aufwiesen. Eine Verminderung der Anzahl Doppelstrangbrüche durch Reparaturreffekte der Ligase könnte man sich vorstellen. Die Behandlung mit dem Enzym könnte außer der Cyclisierung und Oligomerisierung z.B. auch Einzelstrangbrüche schließen, die während der Polymerase-Reaktion durch Radiolyse entstanden sind. Der gleichzeitige Rückgang der lokalen Schäden am markierten Nukleotid läßt sich damit aber nicht erklären. Sollte es sich dabei um einfache Meßfehler handeln, so müßten diese einseitig bei CO_2 aufgetreten sein, da die Ausbeuten der anderen Produkte recht gut zu den Ergebnissen der L^- -Reihe passen. Ein systematischer Meßfehler nur bei der CO_2 -Bestimmung der Ligase-behandelten Proben kann aber ausgeschlossen werden, weil diese im unregelmäßigen Wechsel mit den unbehandelten DNA-Proben aufgearbeitet wurden.

Es wurde schon bei den L^- -Experimenten darauf hingewiesen, daß Daten zur Kinetik der Iod-125-zerfallsinduzierten Schäden fehlen, daß aber in einem einzigen untersuchten Fall ein sehr rasches Fortschreiten der Zahl der Strangbrüche beobachtet wurde. Ein solches Experiment gibt es auch für die L^+ -Reihe. 10 Tage nach dem Zeitpunkt $t_0(L^+)$ wurde von der Originallösung der L^+ -DNA ($C_{DNA} \sim 300 \mu g/ml$, 10 mM PP) nochmals ein elektronenmikroskopisches Präparat gemacht. Sie war während dieser Zeit unter Luftatmosphäre im Kühlschrank bei $4^\circ C$ aufbewahrt worden. Dieses Präparat zeigte ebenfalls eine bereits weit fortgeschrittene DNA-Schädigung (Abb. 31). Vor allem fiel auf, daß nur noch etwa 4 % große Ringe und 2,5 % Dimere vorhanden waren. Andererseits betrug auch hier der Anteil an kleinen Ringen unverändert 4 %. Eine derart rasche Zunahme der DNA-Schäden könnte auch vermuten lassen, daß innerhalb von 2 Tagen, die zwischen der eigentlichen Ligase-Reaktion und dem Zeit-

punkt t_0 der EM-Aufnahme lagen, bereits eine größere Zahl von Ringen und Dimeren zerfallen ist; daß der tatsächliche Anteil zu Beginn der Reaktion höher war.

Die eigentlichen Ursachen für die unterschiedlichen Resultate der beiden Versuchsreihen lassen sich zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht angeben und es sind weitere Untersuchungen zu deren Klärung erforderlich.

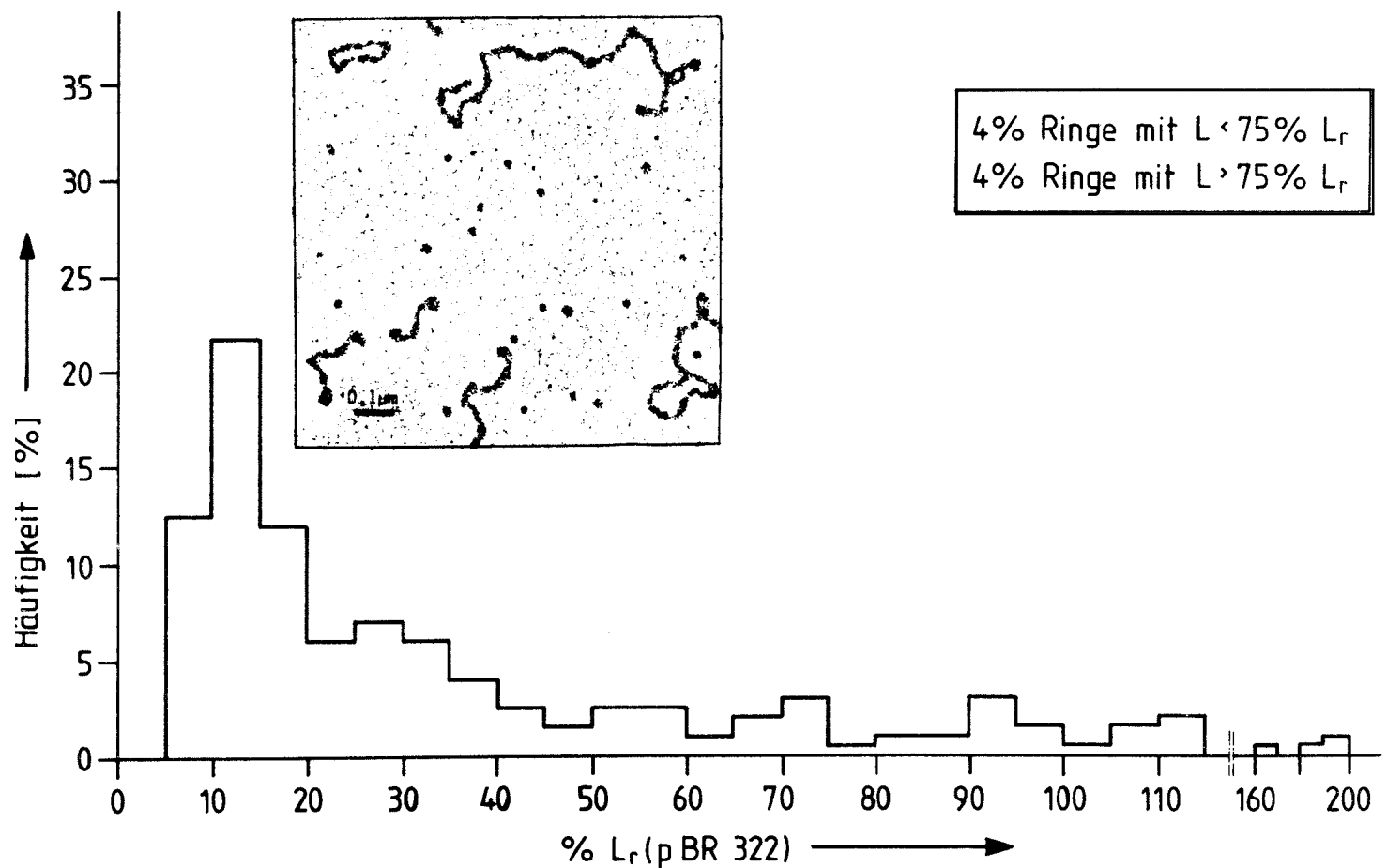


Abb. 31: Längenverteilung der DNA-Fragmente 10 Tage nach t_0 .

4.2.3. Korrelation zwischen Gasentstehung und Doppelstrangbrüchen

Bei den doppeltmarkierten DNA-Proben beider Untersuchungsreihen (L^- und L^+) fiel auf, daß die Bildung gasförmiger Produkte und die Entstehung von Doppelstrangbrüchen miteinander korreliert sind. In Abb. 32 ist die mittlere Bruchzahl $\bar{B}$ ($= B_{100}$) gegen die Ausbeute an $^{14}\text{CO}_2$ (A) bzw. gegen die Summe der gebildeten Gase (^{14}CO , $^{14}\text{CO}_2$ und $[^{14}\text{C}]\text{-C}_2\text{H}_6$) aufgetragen. Die Graphik enthält Daten aus allen 4 untersuchten Medien und zwar sowohl von Experimenten der L^- - als auch der L^+ -Reihe. Die mittleren Bruchzahlen sind die, die man direkt aus der Längenverteilung der DNA-Fragmente erhält. Sie sind nicht in bezug auf eventuelle Brüche am Ort des Einbaus korrigiert (s. S. 77). Es handelt sich also um Minimalwerte. In beiden Fällen erhält man einen streng linearen Zusammenhang zwischen den aufgetragenen Größen. Beide Geraden haben die gleiche Steigung. Sie unterscheiden sich im Ordinatenabschnitt um etwa 10 %-Einheiten. Dies läßt sich folgendermaßen deuten: 10 % Gas entspricht ungefähr der Menge ^{14}CO und $[^{14}\text{C}]\text{-C}_2\text{H}_6$, die aus der Base stammen und mediumunabhängig in allen Fällen gebildet werden. Der Hauptanteil der gasförmigen Zerfallsprodukte ist CO_2 . Dieses Gas entsteht in erster Linie aus der Zuckerkomponente. Deren Zerstörung hängt sehr stark vom Medium und von Struktureffekten (z.B. Ringschluß oder Dimerenbildung) ab. Das Ausmaß der Gesamtschädigung der DNA, ausgedrückt als mittlere Zahl der Doppelstrangbrüche pro Molekül ($\bar{B}$) hängt also direkt mit der Stärke der Fragmentierung des markierten Nukleotids (= lokale Schädigung), speziell mit dem Fragmentierungsgrad des Zuckers zusammen. Die Base wird in allen untersuchten Fällen nahezu gleich stark zerstört. Die aus ihr entstehenden Zerfallsprodukte liefern daher eine mehr oder weniger konstante Grundschädigung der DNA.

Das bei allen doppeltmarkierten Proben gleichermaßen beobachtete Verschwinden der ^{14}C -Aktivität aus der makromolekularen Fraktion und die Abnahme des Anteils ringförmiger DNA-Moleküle in Experimenten der L^+ -Reihe haben gezeigt,

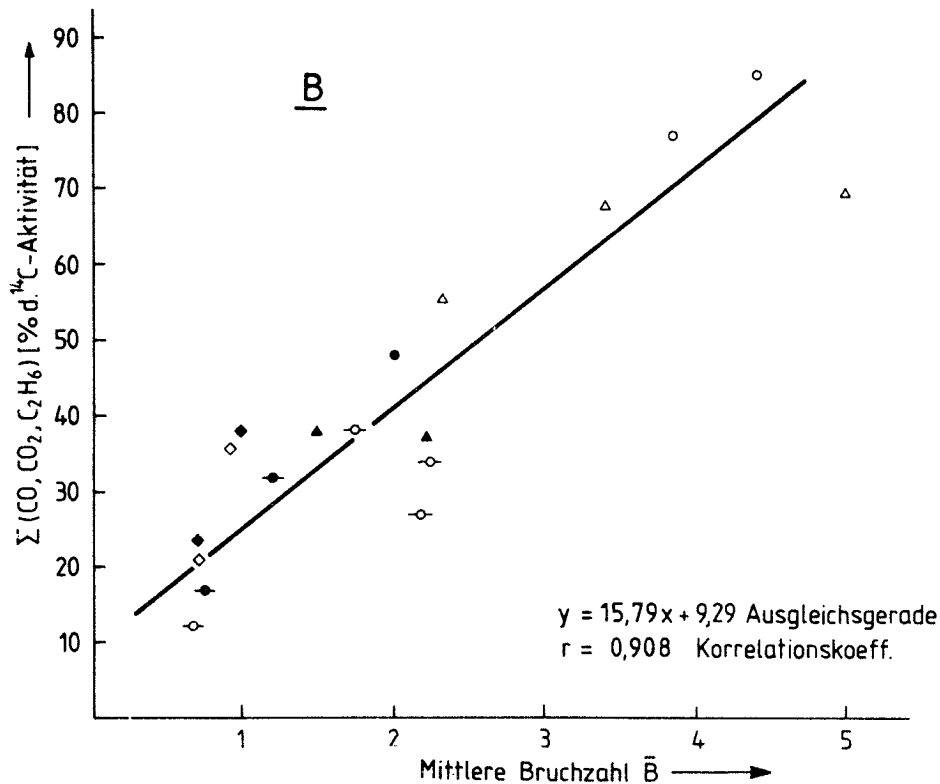
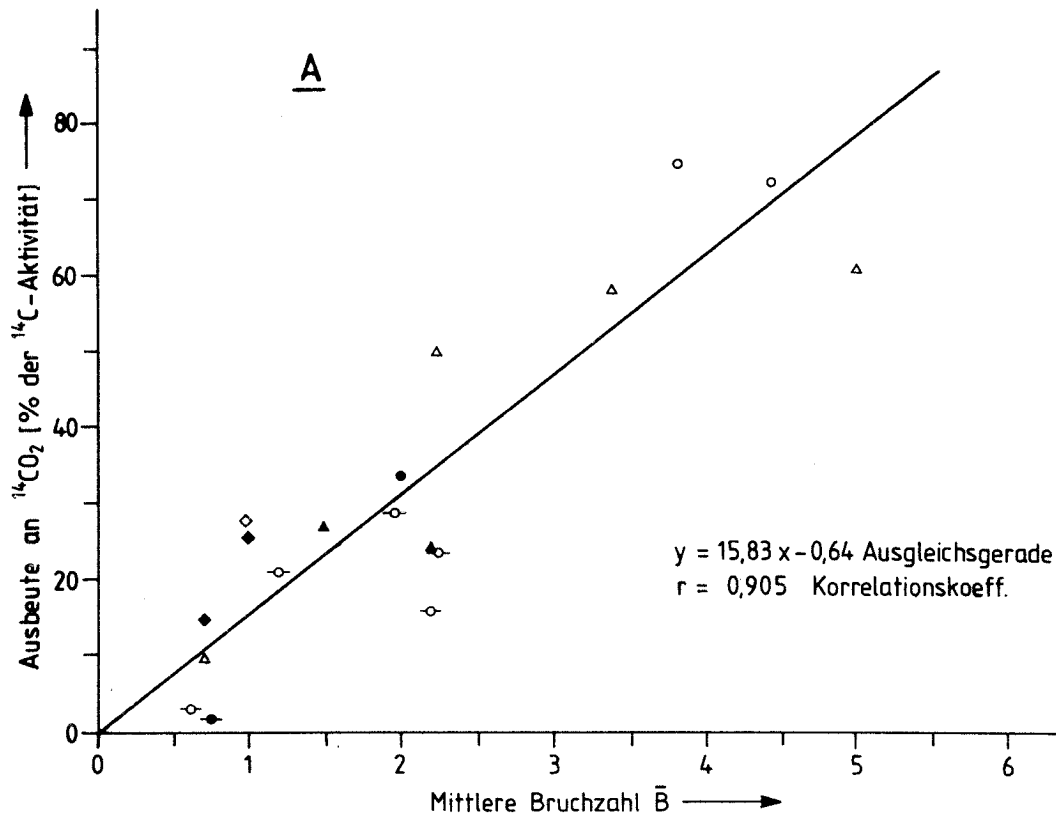


Abb. 32: Korrelation zwischen der Ausbeute an $^{14}\text{CO}_2$ (A) bzw. der Summe der gasförmigen Produkte ^{14}CO , $^{14}\text{CO}_2$ und $[\text{C}^{14}]\text{-C}_2\text{H}_6$ (B) und der mittleren Zahl der Doppelstrangbrüche $\bar{B}$ pro DNA-Molekül.
 ausgefüllte Symbole: L^+ -Reihe; leere Symbole: L^- -Reihe;
 System: I (Δ); II ($\circ$); III ($\diamond$); IV ($-o-$ $-\bullet-$)

daß (mindestens) ein Strangbruch am Ort der Markierung stattfindet. Die Tatsache, daß die Gerade, die die Abhängigkeit der Strangbruchhäufigkeit von der Gesamtmenge der gebildeten Gase zeigt, die Abszisse erst im negativen Bereich bei $\bar{B} = -0,59$ schneidet, deutet dies ebenfalls an. Theoretisch erwartet man nämlich eine Nullpunktskurve, weil für den Fall, daß eine Fragmentierung des markierten Nukleotids nicht erfolgt, auch keine entfernten DNA-Schäden auftreten sollten. Wählt man den Nullpunkt des Koordinatensystems bei $\bar{B} = -1$, d.h. berücksichtigt man den zusätzlichen Doppelstrangbruch am Ort der Markierung, so entspricht der Schnittpunkt der " Σ Gas"-Geraden mit der Abszisse nun einem Wert von 0,41 Brüchen/Molekül. Dieser Wert liegt im Bereich der beobachteten Radiolyseschäden von $\leq 0,4$ Strangbrüchen pro DNA-Molekül und könnte somit als radiolytische Grundschädigung gedeutet werden. Die CO_2 -Gerade, die in Abb. 32 durch den Nullpunkt geht, schneidet dann die Abszisse bei $\bar{B} = 1$. Das bedeutet, daß mit der Entstehung von CO_2 als Fragmentationsprodukt stets mehr als ein Strangbruch verbunden ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Folgen des Zerfalls von Iod-125, das in DNA eingebaut ist, auf molekularer Ebene untersucht. Im Vordergrund stand die Frage nach dem Schicksal des Iod-markierten Nukleotids nach Zerfall des radioaktiven Atoms. Außerdem wurden Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, Aussagen über die Reichweite der zerfallsinduzierten Schäden zu machen, sowie die Frage zu klären, welchen Anteil Radiolyseeffekte einerseits und Transmutationseffekte (Aufladung durch Auger-Effekt) andererseits an den beobachteten Folgen des Zerfallsprozesses haben. Da natürliche DNA keine iodierten Verbindungen enthält, mußte zunächst ein iodiertes synthetisches Analogon hergestellt werden, das sich in DNA einbauen läßt. Als solches diente doppeltmarkiertes [U- ^{14}C , 5- ^{125}I]-Iod-2'desoxycytidin-5'-triphosphat (IdCTP), das sich wie der natürliche DNA-Vorläufer Desoxycytidintriphosphat (dCTP) verhält. Als Ausgangsprodukt zur Synthese diente [U- ^{14}C]-dCTP, bei dem alle 9 C-Atome markiert waren (Markierungsgrad etwa 63 %/C-Atom). Die Iodierung erfolgte mit trägerfreiem Na^{125}I in Gegenwart von Tl(III)-Acetat . Dabei konnte eine radiochemische Ausbeute von 78 % erzielt werden.

Das doppeltmarkierte IdCTP wurde in vitro mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase an der Sal I-Schnittstelle des Plasmids pBR 322 eingebaut. Ein Teil der auf diese Weise iodierten DNA wurde darüberhinaus durch Behandlung mit T4-Ligase wieder zum Ring geschlossen.

Nach mehrmonatiger Lagerung (absorbierte Dosis: $\sim 0,5 - 5 \cdot 10^3$ rad) in verdünnten NaCl- bzw. Phosphatpufferlösungen, die jeweils mit O_2 oder N_2 gesättigt waren, erfolgte die Analyse der stabilen Endprodukte mit Hilfe der Radio-Gaschromatographie, Radiohochdruckflüssigkeitschromatographie und Elektronenmikroskopie.

Zum Vergleich wurden auch die Effekte der internen Radiolyse durch die beim Zerfall von Iod-125 emittierten Elektronen mit ^{14}C -Ioddesoxycytidin-markierten DNA-Proben untersucht, die Na^{125}I als interne Strahlenquelle in der Lösung enthiel-

ten. Die vergleichenden Untersuchungen zeigen, daß die interne Radiolyse nur geringfügige Strahlenschäden hervorruft. Dagegen führt die Transmutation von kovalent gebundenem Iod-125 zur vollständigen Zerstörung des markierten Nukleotids, wobei $^{14}\text{CO}_2$ und ^{14}CO als Hauptprodukte auftreten. Als Nebenprodukte wurden noch einige Prozent Ethan, sowie verschiedene Pyrimidinderivate gefunden. Mechanistische Betrachtungen legen nahe, daß CO und C_2H_6 überwiegend von der Base stammen, während CO_2 sowohl aus der Base als auch aus dem Zucker entsteht.

Die Bildung von CO_2 zeigt einen starken Mediumeffekt. Während in NaCl-Lösung 50-75 % der ^{14}C -Aktivität in Form von CO_2 vorliegen, beobachtet man in Phosphatpuffer maximal 30 %. Als Ursache wird angenommen, daß die Fragmentierung des Zucker- und Basenrests nach zwei verschiedenen Mechanismen abläuft. Danach soll die Zerstörung der Base schon bei der intramolekularen Ladungsneutralisation erfolgen und deshalb durch die Anwesenheit von Radikalfängern nur wenig beeinflußt werden. Der Zucker dagegen dürfte durch die Auger-Radiolyse, speziell die Reaktion mit OH-Radikalen abgebaut werden. Da Phosphationen OH-Radikale abfangen, ist die Zuckerschädigung in Phosphatpuffer niedriger.

Die elektronenmikroskopische Analyse der DNA ergibt, daß die lokalen Schäden stets mit einem Doppelstrangbruch verbunden sind. Darüberhinaus beobachtet man DNA-Doppelstrangbrüche auch noch in Bereichen, die viele hundert Basenpaare vom Ort des Zerfalls entfernt liegen. In Einzelfällen ist der Hauptteil der DNA-Moleküle in bis zu 10 Fragmente zerlegt. Die Längenverteilung dieser Bruchstücke ist nicht statistisch. Vielmehr werden einzelne Fragmentgrößen bevorzugt gebildet. Die Entstehung der Doppelstrangbrüche weit entfernt von der Iod-Markierung wird auf Übertragung von Anregungsenergie innerhalb des DNA-Strangs über das gemeinsame π -Elektronensystem zurückgeführt, wobei einzelne Basen als Energie-"Senken" fungieren. An diesen Stellen treten auch bevorzugt Strangbrüche auf. Zusätzlich können Schäden durch reaktive Spezies der Auger-Radiolyse verursacht werden.

Ein Vergleich zwischen Ligase-behandelter und unbehandelter DNA zeigt, daß die Konfiguration der DNA bzw. die Position des markierten Nukleotids innerhalb des DNA-Strangs für das Ausmaß der Schädigung eine wesentliche Rolle spielen. So weist erstere eine deutlich geringere Zerstörung des markierten Nukleotids auf; außerdem auch weniger Strangbrüche als entsprechende unbehandelte DNA-Proben. Eine solche Verknüpfung zwischen Nukleotidschädigung und Strangbruchhäufigkeit wird in allen Fällen beobachtet. Genauer gesagt, findet man direkte Proportionalität zwischen der Ausbeute an CO_2 bzw. der Gesamtausbeute an gasförmigen Produkten und der mittleren Bruchzahl der DNA über den gesamten untersuchten Bereich. Damit liefert diese Arbeit den ersten experimentellen Beweis dafür, daß die Fragmentierung des Nukleotids nach Zerfall von kovalent gebundenem Iod-125 und die seit langem bekannten biologischen Schäden (Strangbrüche) direkt korreliert sind. Auch die nicht-statistische Häufigkeitsverteilung der Brüche innerhalb der DNA-Kette und die Tatsache, daß das Ausmaß der DNA-Schädigung stark vom Medium und von der Konfiguration des Makromoleküls abhängen, wurde hier erstmals nachgewiesen.

6. AUSBLICK

Die hier beschriebenen Experimente haben gezeigt, daß Art und Ausmaß der Schäden, die durch Iod-125-Zerfall in genetischem Material verursacht werden, von einer Vielzahl Faktoren (DNA-Konzentration, Gasatmosphäre, Pufferzusatz, DNA-Konfiguration etc.) abhängen und daß viele der Einflüsse noch nicht oder nur ansatzweise verstanden sind. Bevor von einer wirklichen Aufklärung der einzelnen Mechanismen gesprochen werden kann, bedarf es noch der Beantwortung einer Reihe von Fragen. Hierfür erscheint die Durchführung folgender weiterer Experimente sinnvoll:

- Systematische Untersuchungen zur Kinetik der Entstehung von Strangbrüchen.

- Untersuchungen unter N_2O -Atmosphäre zur Prüfung des angenommenen Einflusses von OH-Radikalen auf die Zuckerschädigung. Die Erhöhung der Primärausbeute an OH-Radikalen durch die Umwandlung von solvatisierten Elektronen sollte hier zu einer Verstärkung der beobachteten Schäden führen.
- Gleichzeitiger Einbau von jeweils einfach- ^{14}C bzw. ^{125}I -markierten Nukleotiden in unterschiedlicher Entfernung voneinander. Damit sollten sich Aussagen über die Reichweite der "lokalen" Schäden machen lassen und ein detailliertes Bild von der Art der Zerstörung in einem größeren Umfeld des zerfallenden Atoms wurde sichtbar. Mit ^{14}C -markiertem Thymidin oder Desoxyguanosin z.B. (an der SalI-Schnittstelle die jeweils nächsten Nachbarn von Ioddesoxycytidin) ließen sich auch Unterschiede im Produktspektrum von Purinen und Pyrimidinen herausarbeiten.
- Die Größe der markierten DNA durch nachträgliches Schneiden mit einem anderen Restriktionsenzym variieren. Dadurch könnte der Einfluß der DNA-Länge und -Konformation auf das Fragmentationsmuster untersucht werden.
- Ligase-behandelte DNA sollte vor der Lagerung nach Molekülgestalt (Ring, Dimere etc.) getrennt werden, so daß jeweils nur eine ganz bestimmte Konfiguration vorliegt. Strukturabhängige Zerfallseffekte ließen sich dann leichter erkennen und zuordnen.
- Schon erwähnt wurde im Zusammenhang mit der Frage nach möglichen "Sequenzeffekten" die Verwendung anderer DNA-Substrate mit besonders T-reichen oder -armen Zonen bzw. die Markierung an anderen Schnittstellen innerhalb des Plasmids pBR 322.
- Schließlich könnte nach Klärung der vorangegangenen Fragen der Übergang vom in vitro System zu in vivo Bedingungen erfolgen, indem man das markierte Plasmid wieder in eine Zelle einschleust (=DNA-Transformation). So ließe sich der Einfluß, speziell die Effizienz, zellulärer Reparaturmechanismen gegenüber dieser Art Strahlenschäden untersuchen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Szilard, L. and Chalmers, T.A. Chemical separation of the radioactive element from its bombardment isotope in the Fermieffect. *Nature* 134, 462 (1934)
2. Segre, E., Halford, R.S. and Seaborg, G.T. Chemical separation of nuclear isomers. *Phys. Rev.* 55, 321-22 (1939)
3. Wexler, S. Charge states of molecular fragments from CCl_3Br following nuclear decay of $^{80\text{m}}\text{Br}$ and ^{82}Br . *J.Chem. Phys.* 36, 1992-98 (1962)
4. Snell, A.H. and Pleasonton, F. The Atomic and molecular consequences of radioactive decay. *J.Phys.Chem.* 62, 1377-82 (1958)
5. Carlson, T.A. and White, R.M. Decomposition of $(\text{CH}_3^{131}\text{Xe})^+$ following the nuclear decay of $\text{CH}_3^{131}\text{I}$. *J.Chem.Phys.* 36, 2883-87 (1962)
6. Carlson, T.A. and White, R.M. Formation of fragment ions from $\text{CH}_3^{125}\text{Te}$ and $\text{C}_2\text{H}_5^{125}\text{Te}$ following the nuclear decays of $\text{CH}_3^{125}\text{I}$ and $\text{C}_2\text{H}_5^{125}\text{I}$. *J.Chem.Phys.* 38, 2930-34 (1963)
7. Stöcklin, G. *Chemie heißer Atome*, Verlag Chemie, Weinheim (1969)
8. Wexler, S. Primary physical and chemical effects associated with emission of radiation in nuclear processes, in *Actions chimiques et biologiques des radiations 8ieme série* (ed. Haïssinsky, M.), pp. 105-241, Masson et Cie, Paris (1965)
9. Wolfgang, R.L., Anderson, K.C., Dodson, R.W. Bond rupture and nonrupture in the beta decay of carbon-14 studied by double isotopic labeling. *J.Chem.Phys.* 24, 16-23 (1956)
10. Aliprandi, B., Cacace, F., Guarino, A. Chemical effects of nuclear decay in doubly tritiated ethane at atmospheric pressure, in *Chemical effects of nuclear transformations Vol. 2*, (Proc.Symp. Vienna), pp. 471-82, IAEA, Vienna (1965)
11. Cacace, F., Ciranni, G., Guarino, R. A tracer study of the reactions of ionic intermediates formed by nuclear decay of tritiated molecules I. Methane- t_4 . *J.Amer.Chem.Soc.* 88, 2903-07 (1966)

12. Deutzmann, R. and Stöcklin, G. Chemical effects of iodine-125 decay in aqueous solution of 5-iodouracil. Ring Fragmentation as a consequence of the Auger effect. *Rad. Res.* 87, 24-36 (1981)
13. Krisch, R.E. and Zelle, M.R. Biological effects of radioactive decay. The role of transmutation effect. *Adv. Radiat. Biol.* 3, 177-213 (1969)
14. Halpern, A. and Stöcklin, G. Chemical and biological consequences of β -decay, part 2. *Radiat. Environm. Biophys.* 14, 257-74 (1977)
15. Commerford, S.L. Iodination of nucleic acids in vitro. *Biochemistry* 10, 1993-9 (1971)
16. Feinendegen, L.E. Biological damage from the Auger effect and possible benefits. *Radiat. Environm. Biophys.* 12, 85-99 (1975)
17. Stöcklin, G. Chemical and biological effects of β -decay and inner shell ionization in biomolecules: A new approach to radiation biology, in *Radiat. Res. Proc.* 6th Intern. Congr. [Okada, S. ed.], Tokyo, pp. 382-91 (1979)
18. Prusoff, W.H. Chen, M.S., Fischer, P.H., Lin, T.-S., Shiau, G.T., Schinazi, R.F. and Walker, J. Antiviral iodinated pyrimidine deoxyribonucleosides: 5-iodo-2'-deoxyuridine; 5-iodo-2'-deoxycytidine; 5-iodo-5'-amino-2',5'-dideoxyuridine; *Pharmac. u. Therap.* 7, 1-34 (1979)
19. Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C. Heyneker, H.L. and Boyer, H.W. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113 (1977)
20. Sutcliffe, J.G. The complete nucleotide sequence of pBR 322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43, 77-90 (1979)
21. Uliana, R., Creac'h, P.V. et Ducastaing, A. Quelques aspects de la radiodénaturation de l'acide désoxyribonucléique (ADN). *Biochimie* 53, 461-68 (1971)
22. Lafleur, M.V.M., Loman, H. and Blok, J. On the role of phosphate in the irradiation of DNA in aqueous solutions. *Int. J. Radiat. Biol.* 27, 197-200 (1975)

23. Polverelli, M., Bonicel, A. and Tebule, R. Gamma-irradiation of cytosine ^{14}C -2 labelled DNA of E. coli. Identification of the major radiolysis products resulting from rupture of the N-glycosidic bond. J. Radiat. Res. 17, 127-34 (1976)
24. Achey, P.M., Dureya, H.Z. and Michaels, G.S. Choice of solvent for studying the role of water in ionizing radiation action on DNA. Radiat. Res. 58, 83-90 (1974)
25. Jortner, J., Ottolenghi, M., Rabani, J. and Stein, G. Conversion of solvated electrons into hydrogen atoms in the photo- and radiation chemistry of aqueous solutions. J. Chem. Phys. 37, 2488-95 (1962)
26. Anbar, M. and Neta, P. A compilation of specific bimolecular rate constants for the reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals with inorganic and organic compounds in aqueous solution. Int.J.Appl.Radiat. Isotopes 18, 493-523 (1967)
27. Martin, R.F. and Haseltine, W.A. Range of radiochemical damage to DNA with decay of iodine-125. Science 213, 896-98 (1981)
28. Auger, P. Sur l'effet photoélectrique composé. Ann.Phys. Radium 6, 205-11 (1925)
29. Auger, P. L'effet photoélectrique composé. Ann.Phys. (Paris) 6, 183-88 (1926)
30. Pleasonton, F. and Snell, A.H. Ionization following internal conversion in xenon. Proc. Roy. Soc. (London) A 211, 141-52 (1957)
31. Halpern, A. and Stöcklin, G. Chemical and biological consequences of β -decay. Rad.Environm.Biophys. 14, 167-83 (1977)
32. Lederer, C.M. and Shirley, V.S. (eds.), Table of Isotopes, 7th Ed., J. Wiley and Sons Inc., N.Y. (1978)
33. Charlton, D.E. and Booz, J. A Monte Carlo treatment of the decay of ^{125}I . Radiat.Res. 87, 10-23 (1981)

34. Bloomer, W.D. and Adelstein, S.J. 5-¹²⁵I-iododeoxyuridine and the Auger-effect: Biological consequences and implications for therapy, in Pathobiol. Annual, Vol. 8, (Joachim, H.L., ed.), pp. 407-21, Raven Press, N.Y. (1978)
35. Halpern, A. and Stöcklin, G. A radiation chemical resonance effect in solid 5-bromodeoxyuridine; chemical consequences of the Auger effect. Rad.Res. 58, 329-37 (1974)
36. Gomberg, H.J., Luse, R.A., Martinez, F.V. Resonance in radiation effects. Techn. Rep. No. 1, Puerto Rico Nuclear Center, Progress Report No. 1, 76 p., PRNC 12 (1963)
37. Diehn, B., Halpern, A. and Stöcklin, G. Specific inactivation of solid carbonic anhydrase upon X-ray resonance absorption in the constituent zinc atom. J.Amer.Chem.Soc. 98, 1077-79 (1976)
38. Draganič, I.G. and Draganič, Z.D. The radiation chemistry of water. Acad. Press, N.Y. (1971)
39. Nat. Stand Ref. Data Ser., Nat. Bur. of Stand. Reports No. 43 (1975), 51 (1975) and 59 (1977)
40. Ward, J.F. Radiolytic damage to genetic material. J.Chem.Educ. 58, 135-39 (1981)
41. Myers, L.S. Jr., Ward, J.F., Tsukamoto, W.T., Holmes, D.E. Radiolysis of thymine in aqueous solutions; change in site of attack with change in pH. Science 148, 1234-35 (1965)
42. Dražil, V. and Rýznar, L. Comparison of alpha and gamma rays. Radiolysis of thymine. IAEA Report from Biophysical aspects of radiation quality, second panel report 17-25 (1968)
43. Shragge, P.C., Michaels, H.B. and Hunt, J.W. Factors affecting the rate of hydrated electron attack on polynucleotides. Radiat. Res. 598-611 (1971)
44. Khattak, M.N. and Green, J.H. Gamma irradiation of nucleic acid constituents in deaerated aqueous solutions. I. Cytosine. Intern.J.Radiat.Biol. 11, 131-36 (1966)

45. Van Hemmen, J.J. and Bleichrodt, J.F. The decomposition of adenine by ionizing radiation. *Radiat.Res.* 46, 444-56 (1971)
46. Cadet, J. et Téoule, R. Irradiation gamma de la thymine en milieu désaéré isomère cis et trans de l'hydroxy-6-dihydro-5,6-thymine. *Intern.J.Appl.Radiat.Isot.* 22, 273-80 (1971)
47. Hissung, A. and v. Sonntag, C. Radiolysis of cytosine, 5-methyl cytosine and 2'-deoxycytidine in deoxygenated aqueous solution. A pulse spectroscopic and pulse conductometric study of the OH adduct. *Z.Naturf.* 33b, 321-28 (1978)
48. Scholes, G., Ward, J.F. and Weiss, J.J. Mechanism of radiation - induced degradation of nucleic acids. *J.Mol. Biol.* 2, 379-91 (1960)
49. Wilson, R.L. The reactions of oxygen with radiation-induced free radicals in DNA and related compounds. *Int.J.Radiat.Biol.* 17, 349-58 (1970)
50. Holmes, D.E., Ingalls, R.B., Myers, L.S., Jr. ESR spectra of free radicals induced in nucleic acid, purine and pyrimidine bases and selected analogues by exposure to hydrogen atom. *Intern.J.Radiat.Biol.* 13, 225-34 (1967)
51. Ekert, B. Effect of γ -rays on thymine in deaerated aqueous solutions. *Nature* 194, 278-79 (1962)
52. Téoule, M. and Cadet, J. Radiolysis of thymine in aerated aqueous solutions. *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* 1269-70 (1971)
53. Scholes, G. Radiolysis of nucleic acids and their components in aqueous solutions, in *Radiation chemistry of aqueous systems* (ed. Stein, G.) pp. 259-85, Interscience, London (1968)
54. Hayon, E. Optical absorption spectra of ketyl radicals and radical anions of some pyrimidines. *J.Chem.Phys.* 51, 4881-92 (1969)
55. Nucifora, G., Smaller, B., Remko, R. and Avery, E.C. Transient radicals of DNA bases by pulse radiolysis. Effects of cysteine and cysteamine as radioprotectors. *Radiat.Res.* 49, 96-111 (1972)

56. Theard, L.M., Peterson, F.C. and Myers, L.S., Jr.
Nanosecond pulse radiolysis studies of aqueous thymine solutions. *J.Phys.Chem.* 75, 3815-21 (1971)
57. von Sonntag, C. Radiation chemistry of carbohydrates and of the sugar moiety in DNA. *Stud.Phys.Theor.Chem.* 6, 85-98 (1979)
58. von Sonntag, C. and Schulte-Frohlinde, D. Radiation-induced degradation of the sugar in model compounds and in DNA, in *Effects of ionizing radiation in DNA. Physical, chemical and biological aspects* (eds. Hüttermann, J., Köhnlein, W. and Téoule, R.), pp. 204-25, Springer-Verlag, Berlin (1978)
59. Hartmann, V., von Sonntag, C. and Schulte-Frohlinde, D. γ -Radiolyse von 2-Desoxyribose in wässriger Lösung. *Z. Naturf.* 25b, 1394-1404 (1970)
60. Dizaroglu, M., Schulte-Frohlinde, D. and von Sonntag, C. Strand breaks and sugar release by γ -irradiation of DNA in aqueous solution. The effect of oxygen. *Z. Naturf.* 30 c, 826-28 (1975)
61. Hagen, U. Bestimmung von Einzel- und Doppelbrüchen in bestrahlter Desoxyribonukleinsäure durch Molekulargewichtsverteilung. *Biochim. Biophys. Acta* 134, 45-58 (1967)
62. van der Schans, G.P. Het ontstaan van breuken in DNA onder invloed van gamma straling (thesis), Free University Amsterdam (1969)
63. Lett, J.T. and Alexander, P. Crosslinking and degradation of deoxyribonucleic acid gels with varying water contents when irradiated with electrons. *Radiat.Res.* 15, 159-73 (1961)
64. Marmur, J. and Grossman, L. Ultraviolet light-induced linking of deoxyribonucleic acid strands and its reversal by photoreactivating enzyme. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 47, 778-87 (1961)
65. Smith, K.C. Photochemistry of the nucleic acids, in *Photophysiology*, Vol. 2 (Giese, ed.), pp. 329-88, Acad. Press, N.Y. (1964)

66. Raeva, N.F. Role of malondialdehyde and similar compounds in the formation of links in γ -irradiated DNA. Radiobiologija [russ.] 20, 664-70 (1980)
67. So, M., Gill, R. and Falkow, S. The generation of Col E1-Ap^r cloning vehicle which allows detection of inserted DNA. Mol.Gen.Genet. 142, 239-49 (1976)
68. Rodriguez, R.L., Bolivar, F., Goodman, H.M., Boyer, H.W. and Betlach, M. Construction and Characterization of cloning vehicles, in Molecular mechanisms in the control of gene expression (eds. Nierlich, D.P., Rutter, W.J. and Fox, C.), pp. 471, Academic Press, N.Y. (1976)
69. Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. and Falkow, S. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2, 95-113 (1977)
70. Sutcliffe, J.G. and Ausubel, F.M. Plasmid cloning vectors in genetic engineering (ed. Chakrabarty, A.M.) pp. 83-111, CRC, West Palm Beach (1978)
71. Sutcliffe, J.G. The nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of pBR 322. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 3737-41 (1978)
72. Tait, R.O. and Boyer, H.W. On the nature of tetracycline resistance controlled by the plasmid pSC 101, Cell 13, 73-81 (1978)
73. Richtlinien des N.I.H. für Arbeiten auf dem Gebiet der Genneukombination: Nature 262, 2-4 (1976)
74. Clowes, R.C. and Hayes, W. Experiments in microbial genetics, p. 187, John Wiley and Sons, N.Y. (1968)
75. Clewell, D.B. and Helinski, D.R. Supercoiled circular DNA-protein complex in Escherichia coli: purification and induced conversion to an open circular DNA form. Proc. Natl. Acad. Sci. 62, 1159-66 (1969)
76. Britten, R.J., Pavich, M. and Smith, J. A new method for DNA purification, Carnegie Inst. Wash. Yearbook 68, 400-02 (1970)

77. Kuo, K.C., Mc Cune, R.A., Gehrke, Ch.W., Midgett, R., and Ehrlich, M. Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. Nucl. Acid Res. 8, 4763-76 (1980)
78. Linz, U. Synthesis and quality control of ^{125}I - and ^{14}C -labelled 5-iodo-2'-deoxycytidine triphosphate. J. Labelled Comp. Radiopharm. 19, 1151-59 (1982)
79. Linz, U. A volatile buffer system for high-performance anion-exchange chromatography of nucleotides. J. Chrom. 260, 161-63 (1983)
80. Deutzmann, R. Untersuchungen chemischer Konsequenzen des radioaktiven Zerfalls von Iod-125 und Tritium in markierten Pyrimidinbasen mit Hilfe der Doppelmarkierungstechnik und der ESR-Spektroskopie. Dissertation, JÜL-Bericht 1608 (1979)
81. Davis, R.W., Simon, M. and Davidson, N. Electron microscope heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids, in Meth. Enzymology XXI, part D, 413-20 (1971)
82. Bronstein, I.N. and Semendjajew, K.A. Taschenbuch der Mathematik, 10. Aufl., Verlag Harri Deutsch, Zürich und Frankfurt (1970)
83. Vollenweider, H.F., James, A. and Szybalski, W. Discrete length classes of DNA depend on the mode of dehydration. Proc.Natl. Acad Sci. 75, 710-14 (1978)
84. Landbeck, I. and Hagen, U. Action of DNA polymerase I on γ -irradiated DNA. Biochim. Biophys. Acta 331, 318-27 (1973)
85. Bopp, A. and Hagen, U. Endgroup determination in γ -irradiated DNA: Biochim.Biophys. Acta 209, 320-26 (1970)
86. Leadon, S.A. and Ward, J.F. The effect of γ -irradiated DNA on the activity of DNA polymerase, Radiat.Res. 86, 445-58 (1981)
87. Hamaguchi, K. and Geiduschek, E.P. The effect of electrolytes on the stability of the deoxyribonucleate helix. J.Amer.Chem.Soc. 84, 1329-38 (1962)

88. Pouyet, G., Jacob, M. et Daune, M. Hydratation préférentielle de l'acide désoxyribonucléique. *J.Mol.Biol.* 13, 817-32 (1965)
89. Anderson, P. and Bauer, W. Supercoiling in closed circular DNA: dependence upon ion type and concentration. *Biochemistry* 17, 594-600 (1978)
90. Scholes, G. and Weiss, J. Chemical action of X-rays on nucleic acids and related substances in aqueous systems. *Biochem. J.* 53, 567-78 (1953)
91. von Sonntag, C., Dizaroglu, M., Henneberg, D. and Schomburg, G. unpublished results
92. Polverelli, M. and Téoule, R. Identification of radiolysis products of cytosine resulting from the deamination pathway. *Z. Naturf.* 29 c, 12-15 (1974)
93. Keough, G. and Hofer, K.G. Molecular consequences of the Auger effect: The fate of iododeoxyuridine following iodine-125 decay. *Radiat. Res.* 67, 224-34 (1976)
94. Adams, G.E. Current Topics in Radiat. Res. 3 (Ebert & Howard eds.), North Holland Publ. Comp., Amsterdam (1967)
95. Fielden, E.M. and Lillicrop, S.C. The effect of 5-bromouracil incorporation on energy transfer in irradiated DNA, in Radiation protection and sensitization (Moroson, H.L. and Quintilliani, M. eds.), pp. 81-86, Taylor and Francis, London (1970)
96. Rhodes, D. and Klug, A. Helical periodicity of DNA determined by enzyme digestion. *Nature* 286, 573-78 (1980)
97. Rabani, J. The interconvertibility of solvated electrons in hydrogen atoms, in Solvated electrons; Adv. Chem. Series 50, 242-52 (1965)
98. Thomas, J.K. Rates of reaction of the hydroxyl radical. *Trans. Faraday Soc.* 61, 702-7 (1965)
99. Maxam, A.M. and Gilbert, W. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 560-64 (1977)
100. Kovacic, R.T. and van Holde, K.E. Sedimentation of homogeneous double-strand DNA molecules. *Biochemistry* 16, 1490-98 (1977)
101. Sgaramella, V. Enzymatic oligomerization of bacteriophage P22 DNA and of linear SV 40 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69, 3389-93 (1972)

8. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

	<u>Seite</u>
Abb. 1: Schematische Darstellung der experimentellen Schritte zur spezifischen Doppelmarkierung eines Plasmids	3
Abb. 2: Auger-Kaskade im Xe-Atom	8
Abb. 3: Primäre physikalische und chemische Konsequenzen des Auger-Effekts	10
Abb. 4: Zerfallsschema von Iod-125	10
Abb. 5: Verteilung der emittierten Elektronen pro Iod-125-Zerfall. Vergleich: isoliertes Atom - kondensierte Phase	11
Abb. 6: Verteilung der Gesamtelektronenenergie nach Iod-125-Zerfall	11
Abb. 7: Resonanzeffekt in Bromdesoxyuridin nach Absorption monoenergetischer Röntgenstrahlen	12
Abb. 8: Vergleich der Produktspektren nach Zerfall von Iod-125 in [2- ¹⁴ C,5- ¹²⁵ I]-Ioduracil und nach externer Radiolyse	13
Abb. 9: Struktur der DNA-Basen	18
Abb. 10: Plasmid pBR 322 a) genetische Ableitung b) Restriktionskarte	24
Abb. 11: Aktivitätsverlauf nach Entsalzung doppeltmarkierter DNA	31
Abb. 12: Chromatogramm der Reaktionslösung auf RP18/ Amm.phosphatpuffer	34
Abb. 13: Versuchsanordnung zum Abtöplern ¹⁴ C-markierter Gase	36

	<u>Seite</u>
Abb. 14: Chromatogramme verschiedener Test-Trennungen bis 16 möglicher Radiolyse- und Zerfallsprodukte von markiertem IdCMP in DNA	39-41
Abb. 17: Längenverteilung der DNA-Fragmente nach Radiolyse	47
Abb. 18: Gaschromatographische Trennung der flüch- tigen Komponenten einer doppeltmarkierten DNA-Probe nach 4-monatiger Lagerung	50
Abb. 19: Konzentrationsabhängigkeit der Bildung von und 20 ^{14}CO und $^{14}\text{CO}_2$ nach Zerfall von Iod-125 in DNA für verschiedene wässrige Medien. Vergleich L^- - und L^+ -Reihe	51,52
Abb. 21: Längenverteilung der Plasmid-DNA vor und nach der Doppelmarkierung	66
Abb. 22: Längenverteilung der DNA-Fragmente nach und 23 Zerfall von kovalent-gebundenem Iod-125 in den Medien I-IV	68,69
Abb. 24: Verteilung T-reicher Regionen innerhalb des Plasmids pBR 322	71
Abb. 25: Unterschiedliche Längenverteilung und Bruchhäufigkeitsverteilungskurven (Modell) für Fragmentmuster mit $\bar{M}_t = \frac{M_0}{2}$ und $\bar{B} = 1$	74
Abb. 26: Häufigkeitsverteilung der Strangbrüche nach Zerfall von Iod-125 in DNA (Extremwerte)	76
Abb. 27: Längenverteilung der Ligase-behandelten doppeltmarkierten DNA 2 Tage nach der Ligasereaktion	83
Abb. 28: Längenverteilung der Ligase-behandelten und 29 doppeltmarkierten pBR 322-DNA nach Zerfall von eingebautem Iod-125 für verschiedene wässrige Medien	84,85

	<u>Seite</u>
Abb. 30: Häufigkeitsverteilung der Strangbrüche nach Zerfall von Iod-125 in Ligase-behan- delter DNA (Extremwerte)	87
Abb. 31: Längenverteilung der Ligase-behandelten DNA (Originalprobe) 10 Tage nach t_0	90
Abb. 32: Korrelation zwischen der Bildung gasförmiger Zerfallsprodukte und der Bruchhäufigkeit	92

9. VERZEICHNIS DER TABELLEN

	<u>Seite</u>
Tab. 1: G-Werte der primären γ -Radiolyseprodukte des Wassers	15
Tab. 2: Geschwindigkeitskonstanten für Reaktionen von Wasserradikalen mit DNA (-Komponenten)	17
Tab. 3: Referenzsubstanzen für HPLC und deren Reten- tionsvolumina auf verschiedenen Säulen- systemen	38
Tab. 4: Produktverteilung nach interner Radiolyse	46
Tab. 5: Produktverteilung nach Iod-125-Zerfall in doppeltmarkierter DNA (ohne Ligase)	55
Tab. 6: Produktverteilung nach Iod-125-Zerfall in doppeltmarkierter DNA (mit Ligase)	81

10. ANHANG

Die wichtigsten Daten der doppeltmarkierten DNA-Proben (A.1)

System	Proben- Nr.	A _{O, 125} I [μCi]	A _{O, 14} C [10 ⁴ dpm]	A _{O, 125} I=Q 1 - A _{O, 125} I	C _{DNA} [μg/ml]	Y(CO)	Y(CO ₂) [% A _{O, 14} C Q]	Ausbeute Y				B ₅₀	B ₁₀₀ =B̄	P _{O=e-B̄}	N _O
								Y(C ₂ H ₆)	Y(CO ₂ , Base) Y(CO)	Y(CO ₂) CO	Y(CO ₂) CO				
ohne Ligase	1	30,8 ₋₁₀ %	1,15 ₋₁₀ %	0,794	65,8 ₋₁₀ %	10,7 ₋₁₅ %	58 ₋₁₇ %	1,3 ₋₁₇ %	1,2	5,4	11,7	3,4	3,3		0
	2	40,6	1,52	0,793	39,5	8,2	60,7	0,6	1,7	7,4	11,8	5,0	0,7		0
	3	39,8	1,49	0,804	15,4	7,5	49,8	1,6	2,1	6,6	5,0	2,2	11,0		3,7
	4	53,3	1,99	0,807	10,2	6,6	49,2	0,6	2,4	7,5	4,9	2,3	10,0		3,2
	5	53,6	2,00	0,770	106,9	0,9	74,4 ₋₂₀ %	2,1 ₋₂₄ %	28,7	82,7	8,5	3,9	2,0		0
	6	46,8	1,75	0,778	44,5	12,0	75,9 ₋₂₁ %	1,3	2,1	6,3	n.b.	n.b.	-		-
	7	36,8	1,38	0,900	14,3	11,7 ₋₁₇ %	72,0	1,3	1,6	6,2	9,6	4,5	1,1		1,2
	8	24,3	0,91	0,905	4,7	15,4 ₋₁₇ %	79,7	2,5	1,7	5,2	5,4	1,8	16,5		10,9
PP ₃ N ₂ (III)	9	5,2	0,19	0,902	14,1	9,6	9,2	2,0	1,0	1,0	2,5	0,7	49,7		41,6
	10	60,2	2,25	0,770	54,5	7,9	14,4	0,8	1,8	1,8	n.b.	n.b.	-		-
	11	29,6	1,11	0,823	11,6	12,2	28,1	1,1	1,6	2,3	n.b.	n.b.	-		-
	12	37,6	1,41	0,823	7,3	7,5	27,7	0,6	3,5	3,7	3,3	1,0	39,9		30,1
PP ₃ O ₂ (IV)	13	41,3	1,54	0,753	81,0	8,8	2,7 ₋₂₀ %	1,0	0,3	0,3	1,9	0,7	51,2		37,1
	14	39,2	1,47	0,819	38,3	8,9	28,6	0,7	3,2	3,2	6,1	2,0	14,4		8,6
	15	55,1	2,06	0,901	20,8	9,8	23,1	1,4	2,3	2,4	6,3	2,3	11,0		8,3
	16	35,6	1,33	0,915	6,9	9,7	15,3	1,6	1,6	1,6	6,7	2,2	10,8		7,9
mit Ligase I	17	54,2	2,03	0,771	50,2	9,3	26,6 ₋₂₀ %	2,2	2,8	2,9	6,1	1,5	22,3		25,6
	18	47,7	1,78	0,909	18,2	11,0	24,0	1,7	1,5	2,2	5,7	2,2	11,3		6,9
II	19	60,9	2,28	0,755	55,0	11,1	1,3 ₋₃₀ %	0,8	<0,1	0,1	n.b.	n.b.	-		-
	20	71,1	2,66	0,908	26,2	12,0	33,4	2,4	2,3	2,8	5,3	2,0	13,4		7,8
III	21	12,7	0,47	0,810	13,8	8,4	14,7	<0,4	1,8	1,8	2,7	0,7	48,2		39,5
	22	54,6	2,04	0,907	20,6	10,7	25,5	1,7	2,1	2,4	3,6	1,0	37,2		22,1
IV	23	49,3	1,84	0,753	46,5	13,9	1,3 ₋₃₀ %	1,7	<0,1	<0,1	2,7	0,8	49,2		28,4
	24	83,3	3,12	0,910	30,2	9,7	20,7	1,4	2,1	2,1	3,6	1,2	29,2		14,0

Zeichenerklärung zu A1:

$$A_{O, 125I}: {}^{125}\text{I}\text{-Anfangsaktivität} \quad A_{O, 125I} = \frac{A_t}{2^{-n}}$$

mit A_t : ${}^{125}\text{I}$ -Aktivität zum Zeitpunkt der Probenauf-
arbeitung [μCi]

n : Zahl der bis zum Zeitpunkt t verstrichenen
Halbwertszeiten

$A_{O, 14C}$: ${}^{14}\text{C}$ -Anfangsaktivität der Probe:

$$A_{O, 14C} = \frac{A_{O, 125I}}{A_{\text{spez}, 125I}} \cdot A_{\text{spez}, 14C}$$

mit $A_{\text{spez}, 125I}$; $A_{\text{spez}, 14C}$: spezif. Aktivität des
[U- ${}^{14}\text{C}$, 5- ${}^{125}\text{I}$]-IdCTP bezogen auf ${}^{125}\text{I}$ ($\sim 2000 \text{ Ci/mmol}$)
bzw. ${}^{14}\text{C}$ (340 mCi/mmol)

Q : bis zum Zeitpunkt t zerfallener Anteil an ${}^{125}\text{I}$

$Y(x)$: Ausbeute an Produkt x

$$Y(x) = \frac{A_{14C, x}}{A_{O, 14C} \cdot Q} \cdot 100$$

mit $A_{14C, x}$: ${}^{14}\text{C}$ -Aktivität des Produktes x

B_{50}, B_{100} ($=\bar{B}$): Zahl der Doppelstrangbrüche bei 50 bzw. 100 %
der Moleküle

P_o : Nach Poissonverteilung Anteil ungeschädigter Moleküle
bei mittlerer Schädigung der Gesamtprobe mit $\bar{B}$
Doppelstrangbrüchen/Molekül

N_o : tatsächlich beobachteter Anteil ungeschädigter Moleküle


```
100 REM PROGRAMM ZUR BERECHNUNG V. DNA
200 REM BRUCHHAUFIGKEITEN. 17.2.83 P.B
300 REM -----
400 REM
500 DIM N(100),X(100),Y(100)
600 DIM B(100),P(100)
630 DIM A$(35)
700 REM
710 PRINT "VERSUCHSNUMMER EINGEBEN"
720 INPUT V
730 PRINT "TEXTEINGABE (30 ZEICHEN)"
740 INPUT A$
800 PRINT "STARTWERT %MW-SKALA EINGEBEN"
900 INPUT S
1000 PRINT "ENDWERT %MW-SKALA EINGEBEN"
1100 INPUT E
1200 K=0
1300 S1=0
1400 Z=0
1500 N1=0
1600 FOR K=7.5 TO E STEP 5
1700 I = I+1
1800 IF K < S THEN N(I) = 0 :GOTO 2200
1900 PRINT "WICHTUNG N(" I ") EINGEBEN"
2000 INPUT N(I)
2100 P(I) = K
2200 I1 = I
2300 NEXT K
2500 FOR I=1 TO I1 STEP 1
2600 S1=S1+N(I)
2700 NEXT I
2800 FOR I=1 TO I1 STEP 1
2900 Z = N(I)*P(I) + Z
3000 N1 =N1 +N(I)
3100 Y(I) = N1/S1
3200 IF N1=0 THEN X(I)=0 :GOTO 3300
3300 IF N1=0 THEN B(I)=0 :GOTO 3600
3400 X(I) =Z/N1
3500 B(I) =100/X(I)-1
3600 NEXT I
3700 LPRINT "ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR." V
3750 LPRINT "=====
3800 REM AUSDRUCKEN
3810 LPRINT A$
3900 LPRINT" I N(I) X(I) Y(I) B(I)"
4000 FOR I=1 TO I1 STEP 1
4100 LPRINT TAB(1);I;TAB(7);N(I);TAB(12);X(I);TAB(22);Y(I);TAB(32);B(I)
4200 NEXT I
```

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 0
=====

125 I	PBR322	X	LIG	TIME=0	
I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)	
1	3.75	7.5	.0381679	12.3333	
2	5	10.3571	.0890585	8.65517	
3	4	12.598	.129771	6.93774	
4	4.5	15.1812	.175573	5.58711	
5	3.25	17.1341	.208651	4.8363	
6	5.5	20.3846	.264631	3.90566	
7	3.75	22.542	.302799	3.43616	
8	1.5	23.5	.318066	3.25532	
9	2.25	25.1119	.340967	2.98217	
10	1.75	26.4716	.358779	2.77763	
11	1.75	27.9392	.37659	2.5792	
12	.5	28.4	.381679	2.52113	
13	0	28.4	.381679	2.52113	
14	0	28.4	.381679	2.52113	
15	.75	29.3627	.389313	2.40568	
16	1.25	31.0443	.402036	2.2212	
17	8	40.5526	.483461	1.46593	
18	15.75	53.4882	.643766	.869573	
19	10.5	59.7542	.750636	.673522	
20	7	63.4598	.821883	.575802	
21	3.25	65.1637	.854962	.534597	
22	0	65.1637	.854962	.534597	
23	0	65.1637	.854962	.534597	
24	0	65.1637	.854962	.534597	
25	0	65.1637	.854962	.534597	
26	0	65.1637	.854962	.534597	
27	0	65.1637	.854962	.534597	
28	0	65.1637	.854962	.534597	
29	0	65.1637	.854962	.534597	
30	1	66.1912	.86514	.510775	
31	1	67.2529	.875318	.486925	
32	1.25	68.6175	.888041	.457355	
33	0	68.6175	.888041	.457355	
34	2.25	71.2291	.910942	.403922	
35	2.75	74.397	.938931	.34414	
36	2	76.691	.959288	.303934	
37	.75	77.5658	.966921	.289228	
38	2.25	80.2249	.989822	.246495	
39	0	80.2249	.989822	.246495	
40	0	80.2249	.989822	.246495	
41	0	80.2249	.989822	.246495	
42	0	80.2249	.989822	.246495	
43	0	80.2249	.989822	.246495	
44	0	80.2249	.989822	.246495	
45	1	81.7239	1	.223632	
46	0	81.7239	1	.223632	
47	0	81.7239	1	.223632	

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 0

=====				
125 I	PBR322	X	POL	TIME=0
I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	2	7.5	.0205128	12.3333
2	4	10.8333	.0615385	8.23077
3	4.5	13.6905	.107692	6.30435
4	4	16.1207	.148718	5.20321
5	2	17.5	.169231	4.71429
6	2	19.1216	.189744	4.22968
7	2.5	21.3095	.215385	3.69274
8	.75	22.0402	.223077	3.53716
9	.75	22.8889	.230769	3.36893
10	0	22.8889	.230769	3.36893
11	0	22.8889	.230769	3.36893
12	0	22.8889	.230769	3.36893
13	2	26.5306	.251282	2.76923
14	5.25	34.6429	.305128	1.8866
15	3.5	39.1541	.341026	1.55401
16	8	47.5606	.423077	1.10258
17	10	55.3537	.525641	.806566
18	18.75	65.3036	.717949	.53131
19	9.5	69.1509	.815385	.446112
20	12.75	73.7602	.946154	.355745
21	2.5	74.6504	.971795	.339578
22	2	75.4328	.992308	.325683
23	.75	75.7564	1	.32002

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 0

=====

125 I	PBR322	X	POL	2.CHARGE
I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	6	7.5	.0606061	12.3333
2	17	11.1957	.232323	7.93204
3	9	12.9688	.323232	6.71084
4	11	15.407	.434343	5.49057
5	5.5	16.7784	.489899	4.96006
6	5.5	18.3796	.545455	4.44081
7	8.5	20.98	.631313	3.76644
8	6	22.865	.691919	3.3735
9	4.25	24.3041	.734849	3.11453
10	2.5	25.2409	.760101	2.96183
11	3.75	26.7722	.79798	2.73522
12	1.25	27.3287	.810606	2.65916
13	4	29.2359	.85101	2.42045
14	0	29.2359	.85101	2.42045
15	1.25	29.9415	.863636	2.33984
16	2.5	31.4347	.888889	2.1812
17	.5	31.7514	.893939	2.14947
18	.5	32.0927	.89899	2.11597
19	1.75	33.354	.916667	1.99814
20	3	35.5667	.94697	1.81162
21	3	37.7972	.977273	1.6457
22	1.75	39.1244	.99495	1.55595
23	.5	39.5202	1	1.53035

ERGESNISSE DES VERSUCHS NR. 0

=====

125 I PER322 X LIG 2.CHARGE

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	12.5	7.5	.12987	12.3333
2	21.75	10.6752	.355844	8.36752
3	12	12.4459	.48052	7.03475
4	6	13.6005	.542857	6.35268
5	7	15.2426	.615584	5.56055
6	6	16.8295	.677922	4.94195
7	4	18.0235	.719481	4.54832
8	2.5	18.8763	.745455	4.29765
9	1.5	19.4625	.761039	4.1381
10	2.5	20.5528	.787013	3.86552
11	2.5	21.7332	.812987	3.60125
12	1	22.2476	.823377	3.49486
13	2	23.3615	.844156	3.28054
14	3	25.1113	.875325	2.98228
15	.5	25.4204	.880519	2.93386
16	1	26.086	.890909	2.83347
17	1	26.7939	.901299	2.73219
18	3	28.9903	.932468	2.44944
19	1.5	30.1164	.948052	2.32045
20	.5	30.5109	.953247	2.27752
21	1.5	31.7493	.968831	2.14967
22	2	33.4449	.98961	1.98999
23	0	33.4449	.98961	1.98999
24	0	33.4449	.98961	1.98999
25	0	33.4449	.98961	1.98999
26	0	33.4449	.98961	1.98999
27	0	33.4449	.98961	1.98999
28	0	33.4449	.98961	1.98999
29	0	33.4449	.98961	1.98999
30	0	33.4449	.98961	1.98999
31	0	33.4449	.98961	1.93999
32	0	33.4449	.98961	1.98999
33	1	34.8377	1	1.87046

ERGESNISSE DES VERSUCHS NR. 0 (ST)

=====

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	0	0	0	0
2	.75	12.5	7.8534E-03	7
3	1.5	15.8333	.0235602	5.31579
4	1.25	18.2143	.0366492	4.4902
5	.5	19.375	.0418848	4.16129
6	0	19.375	.0418848	4.16129
7	0	19.375	.0418848	4.16129
8	0	19.375	.0418848	4.16129
9	0	19.375	.0418848	4.16129
10	0	19.375	.0418848	4.16129
11	0	19.375	.0418848	4.16129
12	1	28	.052356	2.57143
13	0	28	.052356	2.57143
14	1.5	38.2692	.0680628	1.61307
15	1.5	45.625	.0837696	1.19178
16	5.25	60.2358	.138743	.660141
17	20.5	76.7963	.353403	.302146
18	29.75	84.1536	.664922	.188304
19	16.25	86.873	.835079	.151105
20	9	88.4578	.929319	.130483
21	3.75	89.2297	.968586	.120703
22	3	89.9607	1	.111596

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. R2

=====				
I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	1	27.5	.0135135	2.63636
6	0	27.5	.0135135	2.63636
7	0	27.5	.0135135	2.63636
8	0	27.5	.0135135	2.63636
9	2	40.8333	.0405405	1.44898
10	0	40.8333	.0405405	1.44898
11	1	45	.0540541	1.22222
12	0	45	.0540541	1.22222
13	0	45	.0540541	1.22222
14	2	54.1667	.0810811	.846154
15	2	60	.108108	.666667
16	0	60	.108108	.666667
17	6	71.7857	.189189	.393035
18	26	85.25	.540541	.17302
19	18	89.0517	.783784	.122943
20	10	91.0294	.918919	.098546
21	5	92.1575	.986487	.0850985
22	1	92.4324	1	.0818713

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR.29

=====

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	0	0	0	0
2	2	12.5	.0168067	7
3	0	12.5	.0168067	7
4	0	12.5	.0168067	7
5	2	20	.0336135	4
6	0	20	.0336135	4
7	5	29.7222	.0756303	2.36449
8	1	31	.0840336	2.22581
9	2	33.75	.10084	1.96296
10	0	33.75	.10084	1.96296
11	0	33.75	.10084	1.96296
12	6	43.3333	.151261	1.30769
13	9	51.3889	.226891	.945946
14	5	54.6875	.268908	.828571
15	19	63.1863	.428571	.582622
16	34	70.9118	.714286	.410203
17	23	74.4444	.907563	.343284
18	10	75.9746	.991597	.31623
19	1	76.1555	1	.313103
20	0	76.1555	1	.313103

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR.23

=====

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	0	0	0	0
2	2	12.5	.02	7
3	0	12.5	.02	7
4	2	17.5	.04	4.71429
5	0	17.5	.04	4.71429
6	6	26.5	.1	2.77359
7	5	30.1667	.15	2.31492
8	4	32.7632	.19	2.05221
9	4	35.3261	.23	1.83077
10	2	36.7	.25	1.7248
11	3	38.9286	.28	1.56881
12	9	44.6622	.37	1.23903
13	7	48.2955	.44	1.07059
14	1	48.8333	.45	1.04778
15	5	51.7	.5	.934236
16	2	52.8846	.52	.890909
17	19	62.1479	.71	.609065
18	11	66.2195	.82	.510129
19	15	71.0567	.97	.407327
20	3	72	1	.388889
21	0	72	1	.388889

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 1

=====				
I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	44.75	7.5	.446384	12.3333
2	20.75	9.08397	.653367	10.0084
3	4.25	9.59677	.695761	9.42017
4	4.25	10.3378	.738155	8.6732
5	7.25	11.8692	.810474	7.42515
6	1	12.1201	.820449	7.25078
7	0	12.1201	.820449	7.25078
8	3	13.1892	.850374	6.58199
9	1	13.587	.860349	6.36
10	2.5	14.6831	.885287	5.81055
11	1	15.1602	.895262	5.59623
12	.5	15.4224	.900249	5.48406
13	0	15.4224	.900249	5.48406
14	1	16.0479	.910225	5.23133
15	2	17.366	.930175	4.7584
16	2	18.7336	.950125	4.338
17	3	20.8333	.98005	3.8
18	0	20.8333	.98005	3.8
19	0	20.8333	.98005	3.8
20	0	20.8333	.98005	3.8
21	2	22.5623	1	3.43216

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 2

=====				
I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	53	7.5	.456897	12.3333
2	29	9.26829	.706897	9.78947
3	7	9.91573	.767241	9.08499
4	9	11.0714	.844828	8.03226
5	7	12.1667	.905173	7.21918
6	1	12.3585	.913793	7.0916
7	2	12.8241	.931034	6.79783
8	0	12.8241	.931034	6.79783
9	2	13.4545	.948276	6.43243
10	2	14.1518	.965517	6.06625
11	2	14.9123	.982759	5.70588
12	0	14.9123	.982759	5.70588
13	0	14.9123	.982759	5.70588
14	0	14.9123	.982759	5.70588
15	0	14.9123	.982759	5.70588
16	0	14.9123	.982759	5.70588
17	0	14.9123	.982759	5.70588
18	0	14.9123	.982759	5.70588
19	0	14.9123	.982759	5.70588
20	0	14.9123	.982759	5.70588
21	1	15.7174	.991379	5.36238
22	1	16.5517	1	5.04167

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 3

=====

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	3	7.5	.0365854	12.3333
2	9	11.25	.146341	7.88889
3	18	15	.365854	5.66667
4	11	17.0122	.5	4.87814
5	8	18.7245	.597561	4.3406
6	7	20.4464	.682927	3.89083
7	8	22.5781	.780488	3.42907
8	3	23.4702	.817073	3.26073
9	3	24.5	.853659	3.08163
10	0	24.5	.853659	3.08163
11	3	25.8562	.890244	2.86755
12	2	26.8333	.914634	2.72671
13	3	28.3974	.95122	2.52144
14	0	28.3974	.95122	2.52144
15	1	29.019	.963415	2.44602
16	0	29.019	.963415	2.44602
17	1	29.75	.97561	2.36134
18	0	29.75	.97561	2.36134
19	2	31.4024	1	2.18447

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 4

=====				
I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	4	7.5	.025974	12.3333
2	19	11.6304	.149351	7.59813
3	34	15.1316	.37013	5.6087
4	23	17.25	.519481	4.7971
5	15	18.8684	.616883	4.29986
6	15	20.7273	.714286	3.82456
7	14	22.621	.805195	3.42068
8	4	23.2422	.831169	3.30252
9	5	24.1541	.863636	3.14008
10	0	24.1541	.863636	3.14008
11	7	25.8214	.909091	2.87275
12	3	26.5909	.928571	2.76068
13	5	27.973	.961039	2.57488
14	1	28.2718	.967532	2.53709
15	0	28.2718	.967532	2.53709
16	0	28.2718	.967532	2.53709
17	1	28.6667	.974026	2.48837
18	0	28.6667	.974026	2.48837
19	4	30.4546	1	2.28358

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 5

=====				
I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	48	7.5	.284024	12.3333
2	13	8.56557	.360947	10.6746
3	31	11.5761	.544379	7.6385
4	27	14.0546	.704142	6.1151
5	12	15.2863	.775148	5.54182
6	16	17.1599	.869823	4.82755
7	8	18.2097	.91716	4.49159
8	6	19.1149	.952663	4.23152
9	5	19.9699	.982249	4.00754
10	2	20.3571	.994083	3.91228
11	0	20.3571	.994083	3.91228
12	1	20.6065	1	3.85284
13	0	20.6065	1	3.85284

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 7

=====				
I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	67	7.5	.270161	12.3333
2	71	10.0725	.556452	8.92806
3	39	11.709	.71371	7.54041
4	28	13.1829	.826613	6.58557
5	14	14.0982	.883065	6.09312
6	9	14.8246	.919355	5.74556
7	2	15.0217	.927419	5.65702
8	4	15.4915	.943548	5.45517
9	2	15.7627	.951613	5.34409
10	0	15.7627	.951613	5.34409
11	5	16.6286	.971774	5.01372
12	1	16.8182	.975807	4.94595
13	0	16.8182	.975807	4.94595
14	2	17.2746	.983871	4.78885
15	1	17.5204	.987903	4.70763
16	1	17.7846	.991936	4.62286
17	0	17.7846	.991936	4.62286
18	1	18.087	.995968	4.52882
19	1	18.4073	1	4.43264

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 8

=====

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	17	7.5	.10303	12.3333
2	22	10.3205	.236364	8.68944
3	21	12.8333	.363636	6.79221
4	17	14.9675	.466667	5.68113
5	13	16.7778	.545455	4.96027
6	8	18.0612	.593939	4.53672
7	5	19.0049	.624242	4.26181
8	9	20.8929	.678788	3.78633
9	6	22.2458	.715152	3.49524
10	5	23.4756	.745455	3.25974
11	5	24.8047	.775758	3.0315
12	5	26.2218	.806061	2.81362
13	2	26.8333	.818182	2.72671
14	5	28.4643	.848485	2.51317
15	7	30.7993	.890909	2.24683
16	13	35	.969697	1.85714
17	4	36.2805	.993939	1.7563
18	1	36.6212	1	1.73066

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 9

=====

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	2	7.5	.0124224	12.3333
2	10	11.6667	.0745342	7.57143
3	11	14.4565	.142857	5.91729
4	11	17.0588	.21118	4.86207
5	13	19.9468	.291925	4.01333
6	11	22.3276	.360248	3.47876
7	6	23.75	.397516	3.21053
8	7	25.5986	.440994	2.90647
9	4	26.7667	.465839	2.73599
10	7	28.9634	.509317	2.45263
11	3	29.9706	.52795	2.3366
12	6	32.1154	.565217	2.11377
13	1	32.5	.571429	2.07692
14	2	33.3511	.583851	1.99841
15	0	33.3511	.583851	1.99841
16	2	34.375	.596273	1.90909
17	10	39.3868	.658385	1.53892
18	24	49.1923	.807454	1.03284
19	23	56.4543	.950311	.771346
20	6	58.1918	.987578	.718455
21	1	58.5	.993789	.709402
22	0	58.5	.993789	.709402
23	0	58.5	.993789	.709402
24	1	58.8975	1	.697865

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 12

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	3	7.5	.0180723	12.3333
2	14	11.6176	.10241	7.60759
3	17	14.5588	.204819	5.86869
4	11	16.5	.271084	5.06061
5	19	19.7656	.385542	4.05929
6	8	21.1806	.433735	3.72131
7	9	22.9938	.487952	3.34899
8	4	23.9118	.512048	3.18204
9	7	25.7065	.554217	2.89006
10	4	26.8229	.578313	2.72816
11	7	28.9078	.620482	2.45928
12	3	29.8585	.638554	2.34913
13	2	30.5556	.650602	2.27273
14	3	31.6892	.668675	2.15565
15	5	33.6638	.698795	1.97055
16	8	36.8145	.746988	1.71632
17	3	38.0118	.76506	1.63076
18	9	41.6177	.819277	1.40283
19	20	48.7821	.939759	1.04993
20	6	50.7716	.975904	.969605
21	3	51.803	.993976	.930389
22	1	52.1687	1	.916859
23	0	52.1687	1	.916859

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 13

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	2	7.5	.0285714	12.3333
2	7	11.3889	.128571	7.78049
3	5	13.5714	.2	6.36842
4	0	13.5714	.2	6.36842
5	2	15.3125	.228571	5.53061
6	4	18.75	.285714	4.33333
7	1	19.6429	.3	4.09091
8	3	22.5	.342857	3.44444
9	0	22.5	.342857	3.44444
10	2	24.8077	.371429	3.03101
11	0	24.8077	.371429	3.03101
12	0	24.8077	.371429	3.03101
13	5	31.6936	.442857	2.15522
14	11	42.381	.6	1.35955
15	2	43.9773	.628572	1.2739
16	9	50.5189	.757143	.979459
17	11	56.875	.914286	.758242
18	6	59.9286	1	.668653

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 14

=====

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	31	7.5	.140909	12.3333
2	34	10.1154	.295455	8.88593
3	23	12.0455	.4	7.30189
4	24	14.2857	.509091	6
5	16	15.9375	.581818	5.27451
6	5	16.5602	.604546	5.03859
7	13	18.4247	.663636	4.42751
8	12	20.2532	.718182	3.9375
9	10	21.875	.763636	3.57143
10	4	22.5872	.781818	3.42728
11	16	25.5585	.854546	2.91259
12	3	26.1387	.868182	2.82574
13	6	27.3985	.895455	2.64984
14	3	28.075	.909091	2.56189
15	1	28.3209	.913636	2.53096
16	2	28.8547	.922727	2.46564
17	4	29.9879	.940909	2.33468
18	3	30.881	.954546	2.23824
19	6	32.7315	.981818	2.05516
20	3	33.6872	.995455	1.96849
21	0	33.6872	.995455	1.96849
22	1	34.0455	1	1.93725

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 15

=====

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	27	7.5	.137755	12.3333
2	30	10.1316	.290816	8.87013
3	29	12.6163	.438776	6.92627
4	20	14.4811	.540816	5.90554
5	15	16.095	.617347	5.21309
6	20	18.422	.719388	4.4283
7	13	20.0325	.785714	3.9919
8	5	20.739	.811224	3.82183
9	3	21.2346	.826531	3.7093
10	7	22.5296	.862245	3.43861
11	2	22.9386	.872449	3.35947
12	2	23.396	.882653	3.27424
13	1	23.6494	.887755	3.22843
14	3	24.4774	.903061	3.0854
15	3	25.3611	.918367	2.94304
16	2	25.989	.928571	2.84778
17	4	27.3118	.94898	2.66142
18	2	28.0053	.959184	2.57075
19	5	29.8057	.984694	2.35506
20	2	30.5513	.994898	2.27319
21	1	30.9439	1	2.23166

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 16

=====

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	24	7.5	.105727	12.3333
2	54	10.9615	.343612	8.12281
3	32	12.8636	.484582	6.77385
4	18	14.2188	.563877	6.03297
5	22	16.1667	.660793	5.18557
6	5	16.6935	.682819	4.99034
7	13	18.3036	.740088	4.46342
8	7	19.2714	.770925	4.18903
9	7	20.3571	.801762	3.91228
10	4	21.0484	.819383	3.75096
11	8	22.5515	.854626	3.43429
12	5	23.5553	.876652	3.24533
13	3	24.2079	.889868	3.13088
14	4	25.1456	.907489	2.97683
15	3	25.8971	.920705	2.86143
16	3	26.6981	.933921	2.74558
17	4	27.8241	.951542	2.59401
18	7	29.8543	.982379	2.34961
19	2	30.4556	.991189	2.28347
20	0	30.4556	.991189	2.28347
21	2	31.1344	1	2.21189

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 17

=====

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	15	7.5	.128205	12.3333
2	21	10.4167	.307692	8.6
3	11	12.0745	.401709	7.28194
4	10	13.9035	.48718	6.19243
5	7	15.3906	.547009	5.49746
6	9	17.5	.623932	4.71429
7	3	18.2895	.649573	4.46763
8	3	19.2089	.675214	4.20593
9	1	19.5625	.683761	4.11182
10	3	20.753	.709402	3.81858
11	0	20.753	.709402	3.81858
12	1	21.25	.717949	3.70588
13	1	21.7941	.726496	3.58839
14	0	21.7941	.726496	3.58839
15	2	23.0747	.74359	3.33375
16	9	28.6458	.820513	2.49091
17	14	36.1364	.940171	1.7673
18	4	38.114	.974359	1.62371
19	1	38.6304	.982906	1.58863
20	0	38.6304	.982906	1.58863
21	0	38.6304	.982906	1.58863
22	1	39.2672	.991453	1.54665
23	1	39.9359	1	1.50401

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 18

=====

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	30	7.5	.15873	12.3333
2	23	9.66981	.280423	9.34146
3	11	11.0156	.338624	8.07802
4	27	14.4231	.481482	5.93333
5	16	16.3785	.566138	5.10556
6	23	19.2308	.687831	4.2
7	11	20.656	.746032	3.8412
8	7	21.6892	.783069	3.61059
9	11	23.4748	.84127	3.25988
10	5	24.3598	.867725	3.10513
11	3	24.9551	.883598	3.0072
12	3	25.6176	.899471	2.90356
13	1	25.8626	.904762	2.86659
14	4	26.9286	.925926	2.71353
15	1	27.2159	.931217	2.67432
16	5	28.7431	.957672	2.4791
17	3	29.7011	.973545	2.36688
18	2	30.3763	.984127	2.29204
19	2	31.0904	.994709	2.21642
20	1	31.4683	1	2.17781
21	0	31.4683	1	2.17781

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 20

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	18	7.5	.0779221	12.3333
2	28	10.5435	.199134	8.48454
3	44	13.9444	.38961	6.17132
4	19	15.4358	.471862	5.47846
5	20	17.3062	.558442	4.77828
6	21	19.4333	.649351	4.1458
7	15	21.0758	.714286	3.74479
8	12	22.5283	.766234	3.43887
9	11	23.9894	.813853	3.16851
10	7	25.0128	.844156	2.99795
11	8	26.2931	.878788	2.80328
12	3	26.8204	.891775	2.72851
13	3	27.4043	.904762	2.64906
14	3	28.0425	.917749	2.56602
15	1	28.2747	.922078	2.53674
16	4	29.2742	.939394	2.41598
17	4	30.3281	.95671	2.29728
18	6	31.9714	.982684	2.1278
19	3	32.8261	.995671	2.04636
20	0	32.8261	.995671	2.04636
21	0	32.8261	.995671	2.04636
22	1	33.171	1	2.01468

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 21

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	16	7.5	.0864865	12.3333
2	16	10	.172973	9
3	9	11.6463	.221622	7.58639
4	12	14.1038	.286487	6.0903
5	9	16.0484	.335135	5.23116
6	4	17.0455	.356757	4.86667
7	4	18.2143	.378378	4.4902
8	1	18.5563	.383784	4.38899
9	1	18.9583	.389189	4.27473
10	7	21.9304	.427027	3.55988
11	5	24.0476	.454054	3.15842
12	3	25.3736	.47027	2.94111
13	5	27.663	.497297	2.61493
14	5	29.9742	.524324	2.3362
15	15	36.3393	.605405	1.75184
16	31	46.3462	.772973	1.15768
17	19	51.1728	.875676	.954162
18	11	53.8006	.935135	.858716
19	5	55.0281	.962162	.817254
20	3	55.8149	.978378	.791636
21	0	55.8149	.978378	.791636
22	0	55.8149	.978378	.791636
23	1	56.1539	.983784	.780822
24	0	56.1539	.983784	.780822
25	0	56.1539	.983784	.780822
26	0	56.1539	.983784	.780822
27	0	56.1539	.983784	.780822
28	0	56.1539	.983784	.780822
29	0	56.1539	.983784	.780822
30	1	56.6803	.989189	.764281
31	1	57.2283	.994595	.747389
32	0	57.2283	.994595	.747389
33	0	57.2283	.994595	.747389
34	0	57.2283	.994595	.747389
35	0	57.2283	.994595	.747389
36	1	57.9054	1	.726955

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 22

=====

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	12	7.5	.0540541	12.3333
2	18	10.5	.135135	8.52381
3	20	13.3	.225225	6.5188
4	21	16.0211	.31982	5.24176
5	9	17.3125	.36036	4.77617
6	17	19.9742	.436937	4.00645
7	14	22.1847	.5	3.50761
8	14	24.46	.563063	3.08831
9	4	25.1744	.581081	2.97229
10	14	27.8497	.644144	2.59071
11	9	29.6053	.684685	2.37778
12	6	30.8544	.711712	2.24103
13	3	31.5373	.725225	2.17085
14	10	33.9328	.77027	1.94701
15	2	34.4364	.779279	1.9039
16	4	35.5226	.797297	1.81511
17	1	35.8146	.801802	1.79216
18	5	37.3634	.824324	1.67642
19	18	42.7488	.905406	1.33925
20	11	45.8491	.954955	1.18107
21	0	45.8491	.954955	1.18107
22	1	46.162	.95946	1.16629
23	1	46.4953	.963964	1.15075
24	1	46.8488	.968469	1.13452
25	0	46.8488	.968469	1.13452
26	2	47.6382	.977477	1.09915
27	0	47.6382	.977477	1.09915
28	1	48.0734	.981982	1.08015
29	0	48.0734	.981982	1.08015
30	0	48.0734	.981982	1.08015
31	0	48.0734	.981982	1.08015
32	1	48.5959	.986487	1.05779
33	1	49.1364	.990991	1.03515
34	1	49.6946	.995496	1.01229
35	0	49.6946	.995496	1.01229
36	0	49.6946	.995496	1.01229
37	0	49.6946	.995496	1.01229
38	0	49.6946	.995496	1.01229
39	1	50.3604	1	.985689

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 23

=====

I	N(I)	X(I)	Y(I)	B(I)
1	11	7.5	.0578947	12.3333
2	12	10.1087	.121053	8.89247
3	11	12.5	.178947	7
4	13	15.266	.247368	5.55052
5	9	17.2321	.294737	4.80311
6	9	19.3462	.342105	4.16899
7	8	21.3356	.384211	3.687
8	7	23.1875	.421053	3.31267
9	8	25.3977	.463158	2.93736
10	3	26.2912	.478947	2.80355
11	7	28.5204	.515789	2.50626
12	3	29.5297	.531579	2.38642
13	4	30.9762	.552632	2.22829
14	3	32.1296	.568421	2.11239
15	8	35.2586	.610526	1.83619
16	20	42.2059	.71579	1.36934
17	19	47.7581	.81579	1.09389
18	16	51.9445	.9	.925134
19	4	52.9857	.921053	.887301
20	5	54.3611	.947368	.83955
21	1	54.6547	.952632	.829669
22	3	55.5978	.968421	.798632
23	0	55.5978	.968421	.798632
24	0	55.5978	.968421	.798632
25	1	55.9865	.973684	.786145
26	1	56.3979	.978947	.773117
27	0	56.3979	.978947	.773117
28	1	56.8583	.984211	.758759
29	1	57.3404	.989474	.74397
30	0	57.3404	.989474	.74397
31	0	57.3404	.989474	.74397
32	2	58.4474	1	.710941

ERGEBNISSE DES VERSUCHS NR. 24

=====

I	N(I)	X(I)	Y(I)	D(I)
1	12	7.5	.0465116	12.3333
2	21	10.6818	.127907	8.3617
3	25	13.6207	.224806	6.34177
4	19	15.8117	.29845	5.32444
5	25	18.6765	.395349	4.35433
6	19	20.8471	.468992	3.79683
7	15	22.6838	.527132	3.40843
8	21	25.3344	.608527	2.9472
9	19	27.7273	.682171	2.60656
10	8	28.8043	.713178	2.4717
11	13	30.698	.763566	2.25754
12	9	32.0874	.79845	2.11649
13	6	33.0896	.821706	2.0221
14	5	33.9977	.841085	1.94138
15	5	34.9775	.860465	1.85898
16	4	35.8186	.875969	1.79185
17	4	36.7174	.891473	1.72351
18	5	37.9043	.910853	1.63823
19	5	39.1458	.930233	1.55455
20	4	40.1844	.945736	1.48853
21	4	41.2702	.96124	1.42306
22	2	41.84	.968992	1.39006
23	1	42.1414	.972868	1.37296
24	0	42.1414	.972868	1.37296
25	0	42.1414	.972868	1.37296
26	2	42.8557	.98062	1.33341
27	1	43.2284	.984496	1.3133
28	1	43.6177	.988372	1.29265
29	1	44.0234	.992248	1.27152
30	1	44.4455	.996124	1.24995
31	1	44.8837	1	1.22798

Herrn Prof. Dr. G. Stöcklin danke ich für die interessante Aufgabenstellung und die Unterstützung dieser Arbeit.

Auch Herrn Dr. A. Halpern bin ich für sein stetes Interesse und seine Gesprächsbereitschaft zu großem Dank verpflichtet.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Kössel von der Universität Freiburg für wertvolle Hinweise und Gespräche bedanken.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm und dem Institut für Biotechnologie der KFA Jülich danke ich für die großzügige Bereitstellung der Laboreinrichtungen und die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe während der Durchführung der Experimente zur Plasmidgewinnung und -Reinigung.

Für die Erlaubnis, das Elektronenmikroskop benutzen zu dürfen, bin ich Herrn Dr. T. Schober vom Institut für Festkörperforschung der KFA Jülich sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt Herrn M. Schüller für die überaus sorgfältige Durchführung der gaschromatographischen Analysen. Bei der Glasbläserei, im Besonderen bei Herrn A. Schwaitzer, bei den Herren J. Knieper und H. Prinz vom Strahlenschutz und bei dem Fotografen, Herrn W. Schulte, möchte ich mich ebenfalls herzlich bedanken.

Frau E. Wittig und Herrn A. Gabrysch bin ich für die Mühe und Ausdauer beim Schreiben der Arbeit bzw. beim Anfertigen der Zeichnungen außerordentlich dankbar.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts und ganz besonders bei den Herren W. Wutz, P. Laufer, H. Backhausen und M. Reiche bedanken für die Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit sowie für das freundliche Klima im ICH-1.

