3436

Aus dem Institut für Molekulare Biologie der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, Physikalische Abteilung, Graz (H.W.), aus der Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung, Stöckheim über Braunschweig (W.M.) und aus dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Graz (O.K.)

Die Wechselwirkung der Desoxyribonucleinsäure mit dem Actinomin nach Röntgenkleinwinkelmessungen

Von H. Wawra, W. Müller und O. Kratky

ZUSAMMENFASSUNG:

Es wird die Wechselwirkung von Na-DNS und Actinomin in verdünnten, wäßrigen NaCl-Lösungen mit den Methoden der Röntgenkleinwinkelstreuung untersucht. Dafür mußten aus hochmolekularer DNS durch Ultraschallabbau Teilchen geeigneter Länge hergestellt werden, so daß neben dem Querschnitt auch die Teilchenlänge mit der Röntgenkleinwinkelstreuung noch zu erfassen war. Die Messungen erfolgten an mit Actinomin gesättigten DNS-Lösungen bis herab zu einer DNS-Konzentration von 0,045 g/100 ml. Es konnte dabei eine Streckung der abgebauten DNS-Partikel bei Anlagerung von Actinomin um 18% festgestellt und die Menge des an die DNS gebundenen Actinomins bestimmt werden: im Mittel wird auf 7,1 Basenpaare ein Actinomin-Molekül angelagert. Gleichzeitig wurde eine die DNS-Partikel umgebende Hülle aus Gegen- und Bei-Ionen durch Beugung festgestellt und deren räumliche Dimension ermittelt. Im Verlauf der Auswertung ist es auch gelungen, aus den vorliegenden Pseudo-Querschnittsstreukurven die für unendlich lange Teilchen gültigen Querschnittsstreukurven-Innenteile zu rekonstruieren.

SUMMARY:

The interaction of Na-DNS and actinomine in diluted aqueous NaCl solutions is investigated by means of small angle X-ray scattering. Ultrasonic degradation of high molecular DNS yielded particles of suitable length so that besides the cross section also the particle length could be determined. DNS solutions saturated with actinomine have been measured down to a DNS concentration of 0,045 g/100 ml. We observed an extension of the DNS fragments after interacting with actinomine by 18%. The amount of actinomine in the addition compound has been determined: As an average, 7.1 base pairs are combined with one actinomine molecule. Also a shell of counter and by ions surrounding the DNS particles has been found and its dimensions have been determined. From the pseudo cross section scattering curves the inner parts of the cross section scattering curves valid for infinitely long particles could be reconstructed as calculations proceeded.

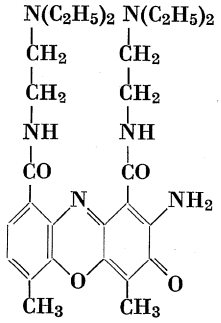
*) Erweiterte Fassung vom 8. Juni 1970.

Einleitung

Die Wechselwirkung der Actinomycin-Antibiotika mit der Desoxyribonucleinsäure (DNS), die 1960 von KERSTEN, KERSTEN und RAUEN[1] entdeckt wurde, wirkt sich intrazellulär in einer nachhaltigen Hemmung des Transscriptionsschrittes in der Proteinbiosynthese aus [2–5]. Die hohe Spezifität dieser Hemmwirkung lenkte schon seit längerem das Interesse mehrerer Arbeitsgruppen auf die Struktur des im Rahmen dieser Wechselwirkung entstehenden Actinomycin-DNS-Komplexes hin.

Als erste entwickelten HAMILTON, FULLER und REICH[6] 1963 ein Strukturmodell für den Komplex, in welchem sich das Actinomycin an die Oberfläche der DNS-Helix anlagert und dabei spezifische Wasserstoffbrücken zwischen geeigneten Gruppen des Actinomycin-Chromophors und entsprechenden Gruppen der Guaninbasen ausbildet, die für die Bindung des Actinomycins unerläßlich sind. Dieses Modell erklärte zwar die Guaninspezifität der Actinomycine, ließ aber die Frage nach den Ursachen für die ungewöhnlichen hydrodynamischen und kinetischen Eigenschaften des Komplexes ungeklärt. 1968 publizierten MÜLLER und CROTHERS[7] einen neuen Strukturvorschlag, der auf thermodynamischen, hydrodynamischen und kinetischen Messungen basiert. Nach diesem Modell schiebt sich bei der Komplexierung der Chromophor der Actinomycine zwischen die Basenpaare der DNS („intercalation") und entfaltet seine Guaninspezifität in erster Linie über elektronische Wechselwirkungen mit den π-Systemen der Basen. 1969 zeigte WELLS[8] mit Hilfe von sequenzisomeren synthetischen Desoxypolynucleotiden doppelhelicaler Sekundärstruktur, daß neben dem Guanin offenbar auch die nächsten Nachbarbasen die Affinität der DNS für die Actinomycine bestimmen. Auf der Basis des Einschubmodells[7] ist dies leicht verständlich.

Bei den Untersuchungen, die zum Einschubmodell führten, wurden einige Phenoxazonderivate u. a. das basische N-substituierte Actinocindiamid *Actinomin* (s. unten) als Modellverbindung für die Funktion des Actinomy-



cinchromophors bei der Bindung der Actinomycine an die DNS verwandt. Dies erschien insofern gerechtfertigt, als das Actinomin bei dieser Wechselwirkung hinsichtlich Farbeffekt und Auswahl zwischen Desoxy- und Ribopolynucleotid das gleiche Verhalten zeigt wie die Actinomycine selbst. Viskositätsmessungen am DNS-Komplex dieser Modellverbindungen zeigten u. a., daß die für einen Einschubkomplex zu erwartende Viskositätssteigerung mit zunehmender Beladung der DNS auftritt. Da man diesen Effekt auf die mit dem Einschub verbundene Längenzunahme und Flexibilitätsabnahme des Polymeren zurückführt[9], haben wir versucht, die Längenzunahme durch Röntgenkleinwinkelmessungen und durch Streulichtmessungen direkt nachzuweisen. Beide Verfahren setzen DNS-Proben geeigneter Teilchengrößen voraus, die wir uns in bekannter Weise durch Ultraschallabbau hochmolekularer DNS hergestellt haben.

Als DNS verwenden wir ein käufliches Produkt der Firma Sigma, St. Louis, USA (Typ I), welches wir durch Ultraschall in beschriebener Weise[7] abbauten. Die DNS wurde anschließend einer Phenolextraktion unterworfen und danach gründlich gegen Natriumphosphatpuffer, pH 7, 10^{-3} *m* an Äthylendiamintetraacetat dialysiert.

In dieser Publikation werden die Ergebnisse der Röntgenkleinwinkelmessungen mitgeteilt; eine entsprechende Arbeit über die Ergebnisse der Streulichtmessungen ist in Vorbereitung.

Die Röntgenkleinwinkeluntersuchung

1. *Zunahme des Streumassenradius mit der Beladung und ihre qualitative Deutung*

Bezüglich der Theorie und der experimentellen Methodik verweisen wir auf zusammenfassende Arbeiten [10,11].

Es wurde eine Reihe von Lösungen des oben beschriebenen Präparates verschiedener Konzentration hergestellt, indem wir von der Stammlösung $c_0 = 1{,}44$ g/100 ml ausgingen und stufenweise auf das Doppelte verdünnten bis herunter zu $^1/_{32}$ der Ausgangskonzentration; also bis 0,045 g/100 ml. Mit diesen reinen Na–DNS-Lösungen wurden solche verglichen, die Actinomin als Bodenkörper enthielten, also mit dieser Substanz gesättigt waren.

Da bei der Verdünnung nicht nur die gemessene Streuintensität des Gelösten entsprechend niedriger wird, sondern gleichzeitig das Verhältnis der Streuintensität des Gelösten zum Lösungsmittel und der sonstigen Blindstreuung in gleicher Weise abnimmt, verstehen wir, daß eine zuneh-

mende absolute Meßgenauigkeit erforderlich war, um nach der Differenzbildung der Streuung der Lösung und der Blindstreuung die gleiche relative Genauigkeit zu erhalten (vgl. [11]). Man bedenke, daß die verdünntesten Lösungen nur mehr eine Konzentration von 0,045 % aufweisen, die weit unter den von vielen Autoren bei Nucleinsäurelösungen verwendeten liegt. Die Ergebnisse wurden durch vielfache, oft 10fache Wiederholung der Messungen gesichert.

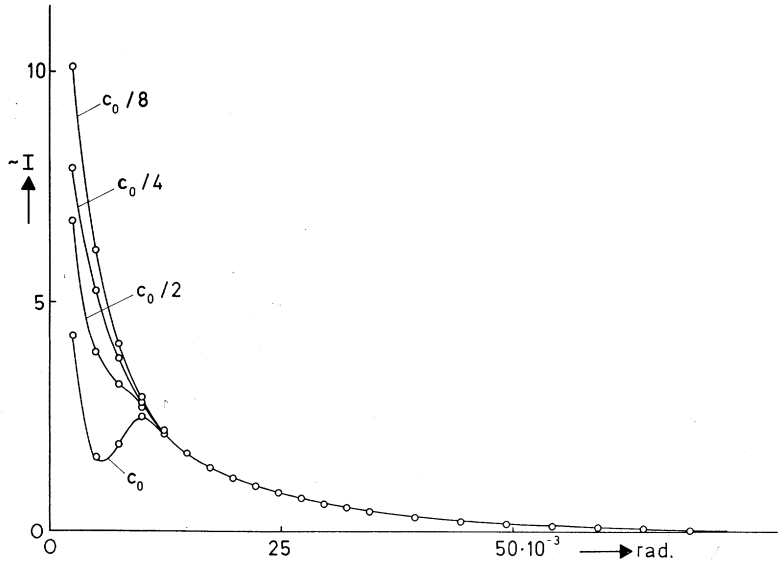


Abb. 1. Konzentrationsreihe der Streukurven abgebauter Na-Desoxyribonucleinsäure, pH 7, 0,01 *m* NaCl, c_0 = 1,44 g/100 ml

Bei den höheren Konzentrationen tritt, wie Abb. 1 zeigt, ein sehr starker Interferenzeffekt auf, der nicht nur von der Undurchdringlichkeit der Teilchen im Sinne von DEBYE herrührt, sondern offenkundig auf eine weitgehende Parallelordnung der stäbchenförmigen Partikel zurückgeht. Da selbst bei den niedrigsten Konzentrationen von 0,045 g/100 ml die Interferenzeffekte immer noch zu stark waren, um eine gesicherte Extrapolation auf die Konzentration Null durchzuführen, wurde bei den gleichen Konzentrationen nach Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 0,30 *m* gemessen. Tatsächlich ergeben sich jetzt Streukurven ohne Interferenzmaxima (Abb. 2), und die Extrapolation auf die Konzentration Null ist nun möglich. Wir ersehen an der starken Konzentrationsabhängigkeit, daß bei Nucleinsäuren die Anwendung so niedriger Konzentrationen zur Erzielung gesicherter Ergebnisse notwendig ist.

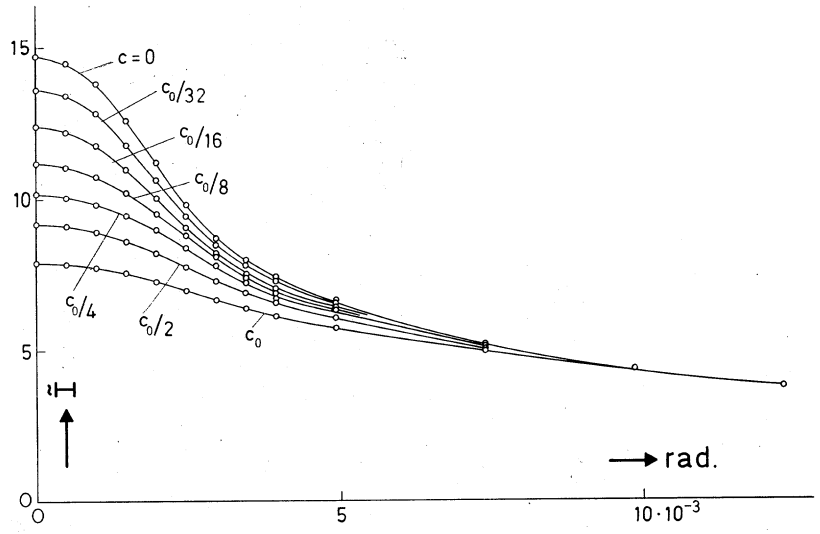


Abb. 2. Konzentrationsreihe der Streukurven abgebauter Na-Desoxyribonucleinsäure, 0,30 *m* NaCl, c_0 = 1,44 g/100 ml

Die mit dem Kollimationseffekt (Längsverschmierung) behaftete Kurve muß entschmiert werden*) und führt dann auf die Partikelstreuung der Na–DNS. In gleicher Weise wurden die Messungen an den Lösungen ausgewertet, die zusätzlich mit Actinomin gesättigt waren.

Die Berechnung der Masse pro Längeneinheit gelöster langgestreckter Teilchen ist aus der Absolutintensität möglich. Die zugehörige Theorie wurde im Grazer Arbeitskreis erstmalig abgeleitet[13], und ebenso wurden hier die ersten Messungen dieser Art durchgeführt[14]. Man braucht zur Auswertung das partielle spezifische Volumen $\bar{v}$ der gelösten Substanz. Es wurde aus der Dichte der Lösungen berechnet, die nach der am Grazer Institut zu hoher Präzision entwickelten Schwingungsmethode auf 6 Stellen gemessen werden konnte[15]. Mehrere Messungen bei 20 °C führten in guter Übereinstimmung auf das partielle spezifische Volumen der Na–DNS von $\bar{v}_1 = 0{,}56$. Für die Masse pro Längeneinheit ergab sich dann in Übereinstimmung mit Luzzati *et al.*[16] $M_q = 206/\text{Å}$.

Die abgebaute Na–DNS hat einen Streumassenradius von R = 148 Å, bei dem mit Actinomin beladenen Molekül dagegen finden wir den höheren Wert von 166,4 Å (Abb. 3). Der Effekt ist qualitativ damit zu deuten,

*) Es sei auf eine zusammenfassende Darstellung aller mit der Kollimation zusammenhängenden Probleme verwiesen[12].

daß eine Aufwicklung der Doppelhelix an den Bindungsstellen erfolgt, die eine entsprechende Verlängerung des Moleküls bewirkt. Eine quantitative Deutung erfordert die Berücksichtigung der seitlichen Dimensionen des Moleküls und, wie wir weiter unten zeigen, auch einer den Streumassenradius beeinflussenden Ionenhülle.

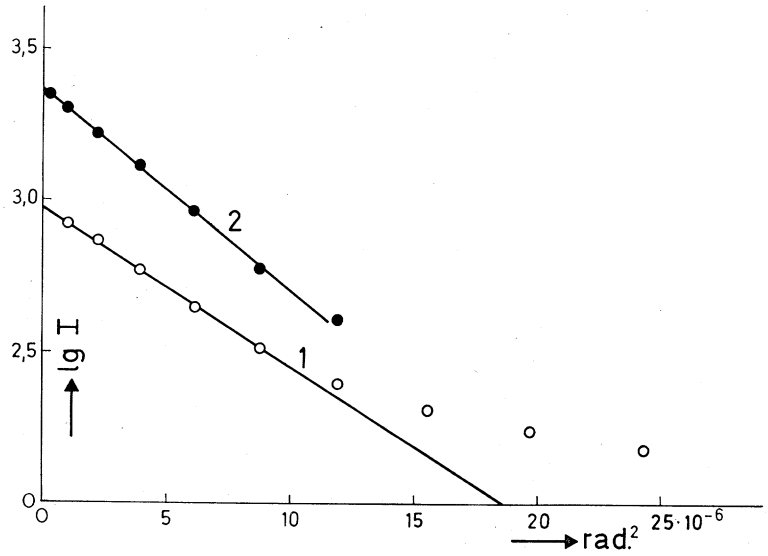


Abb. 3. GUINIER-Auftragung des Innenteils der entschmierten Streukurven: 1. abgebaute Na-Desoxyribonucleinsäure, 0,30 *m* NaCl, R_1 = 148 Å; 2. abgebaute Na-Desoxyribonucleinsäure + Actinomin, 0,30 *m* NaCl, R_2 = 166,4 Å

Die ebenfalls zur Diskussion stehende Möglichkeit, die Vergrößerung des Streumassenradius darauf zurückzuführen, daß die vorher verkrümmte Gestalt des Moleküls geradlinig wird, läßt sich ausschließen. Da dieser Punkt aber für die Interpretation aller weiteren Ergebnisse von großer Bedeutung ist, sei eine nähere Begründung gegeben.

EISENBERG und COHEN[17)] beweisen anhand von viskositäts-, lichtstreuungs- und elektronenoptischen Messungen an DNS-Bruchstücken mit M = 465000, daß es sich bei DNS-Teilchen dieser Größe um Stäbchen handelt, deren gemessene Länge trotz ihrer Flexibilität (BROWNsche Molekularbewegung) noch 89 % ihrer wirklichen Länge ausmacht, also die

Verkürzung des geradegestreckten Moleküls 11 % beträgt. Die von uns untersuchten Teilchen haben im nicht beladenen Zustand ein Molekulargewicht von etwa 100000, sind also um den Faktor 4,6 kürzer als die von COHEN und EISENBERG untersuchten. Unter der Annahme einer gleichen Persistenzlänge beider Präparate ergibt die Anwendung der Theorie des kontinuierlich verkrümmten Fadenmoleküls[18], daß bei unseren Präparaten die Verkürzung nur etwa 11/4,6 = 2,5 % beträgt, während die Deutung des Unterschieds zwischen beladener und unbeladener DNS durch Verkrümmung die Annahme einer Kontraktion von 11 % (Unterschied zwischen den Streumassenradien) fordern würde.

Es besteht ferner keinerlei Evidenz dafür, daß eine geringe Verkrümmung, wie sie am Molekül mit M = 465000 nachgewiesen wurde, bei der Beladung einer vollständigen Geradestreckung Platz macht, so daß es zweifelhaft erscheint, ob diese überhaupt einen meßbaren Anteil zur Vergrößerung des Streumassenradius beiträgt; nach allgemeinen Erwägungen wird schließlich für unser kürzeres Molekül von vornherein eher eine größere Persistenzlänge und daher eine noch geringere Längenänderung bei der vollständigen Geradestreckung anzunehmen sein. Andererseits soll aber darauf hingewiesen werden, daß Messungen von SADRON *et al.*[19] für hochmolekulare DNS Persistenzlängen von etwa 400 Å ergaben, die sehr wohl auf Effekte der bei unseren Messungen auftretenden Größenordnung führen könnten. Nun gebührt aber den neuen Messungen von COHEN und EISENBERG schon deshalb der Vorzug, weil sie an Teilchen eines Molekulargewichtes durchgeführt wurden, dessen Größenordnung unserem Präparat entspricht. Die Diskrepanz zwischen SADRON einerseits und COHEN und EISENBERG andererseits wäre in sehr plausibler Weise dahingehend zu deuten, daß beim Abbau eine gewisse Geradestreckung stattgefunden hat. Dies würde wieder dafür sprechen, daß bei unserem noch kürzerkettigen Präparat die Persistenzlänge noch größer und daher die überhaupt mögliche Kontraktion noch kleiner ist. Es scheint angesichts dieser Sachlage vernünftig, bei der Auswertung unserer Messungen die nach obigem sicher in guter Näherung zulässige Annahme zu machen, daß die Ketten sowohl im beladenen als auch im unbeladenen Zustand praktisch vollständig geradegestreckt sind.

Aus Lichtstreuungsmessungen kommt LITZLER[20] an einem abgebauten Präparat zu M = 490000 und berechnet aus dem gefundenen Streumassenradius unter Annahme eines gestreckten Stäbchens den Wert M/Å = 206. Genau den gleichen Wert erhielten wir für die Masse pro Längeneinheit bei der Auswertung unserer Absolutmessungen (siehe oben).

2. *Interpretation der zu hohen Nullintensität als Effekt einer Ionenhülle und Berechnung der wahren Länge*

Nachdem wir nun eine erste Information über die Länge der Moleküle erhalten haben – die wahre Länge ist bei *sehr dünnen* Stäbchen $\sqrt{12}$ mal größer als der Streumassenradius – und die Masse pro Längeneinheit bestimmt ist, läßt sich ein Molekulargewicht von etwa 100000 berechnen, das übrigens auch mit den Ergebnissen der Lichtstreuungsmessung übereinstimmt. Die absolute Intensitätsmessung ergab aber einen ungefähr 2,5-fach höheren Wert. Diese scheinbare große Diskrepanz konnte durch ein genaues Studium des innersten Teiles der Querschnittskurven aufgeklärt werden. Es zeigt sich, daß der Streuung des DNS-Moleküls in diesem Bereich eine weitere Rest-Streukurve überlagert ist (Abb. 4, Konzentrationsreihe).

Es wurde der Versuch unternommen, diesen zusätzlichen Effekt auf konzentrisch zum zylindrischen Teilchen angeordnete Massen zurückzuführen. In diesem Fall hat man eine Amplitudenzerlegung des Querschnittsfaktors vorzunehmen[21,10] (nicht eine Intensitätszerlegung). Sie erfolgt in der Weise, daß man zunächst den Außenteil der Querschnittskurve unter Annahme eines GAUSSschen Verlaufs (mit $R_q = 8{,}4$ Å) nach innen fortsetzt (strichlierte Kurven in Abb. 4). (Die Auswertung wird nur für die der kleinsten Konzentration entsprechende Kurve vorgenommen.) Damit unterstellen wir für die weitere Betrachtung zunächst die Fiktion, daß die Stäbchen unendlich lang seien (andernfalls würde der Querschnittsfaktor beim Streuwinkel Null auf den Wert Null abfallen). Dieser Teil der gesamten Querschnittskurve wird als der reine Nucleinsäureanteil interpretiert. Den Restanteil erhält man nach Umrechnung in die Amplitude (= Wurzel aus der Intensität) gemäß:

$$\sqrt{(I \cdot m)_{exp}} = \sqrt{(I \cdot m)_{DNS}} + \sqrt{(I \cdot m)_{Rest}} \qquad (1)$$

Die Restamplitude $\sqrt{(I \cdot m)_{Rest}}$ ergibt nach Rückrechnung auf Intensität die in Abb. 5 eingezeichneten Punkte.

Es erwies sich als sehr günstig, daß wegen der sehr verschiedenen Dimensionen von „Kern“ und „Hülle“ der nach Abtrennung des äußeren GAUSSschen Teils (Abb. 4 strichliert) verbleibende Rest sehr schnell auf Null absinkt.

Bei der weiteren Anwendung der Beziehung (1) haben wir zu beachten, daß wir auch den Hüllenanteil gegen den Winkel Null – wieder unter der Fiktion unendlich langer Teilchen – extrapolieren müssen. Dazu machen wir von der Tatsache Gebrauch, daß in der Gesamtstreukurve der I_0-Wert beträchtlich größer ist (wir sprachen vom etwa 2,5 fachen) als der nach der Länge des Moleküls zu erwartende Wert. Also würde auch die Nullintensität des gesamten Querschnittsfaktors bei Vorliegen unendlich langer Stäbchen um einen mit f bezeichneten Faktor größer sein als der Nullwert der Amplitude des Kerns. Eine Analyse, in welche Lage und Intensität des Nebenmaximums und der gemessene Auslauf des Hauptmaximums der in Abb. 5 dargestellten Reststreukurve eingeht, ermöglicht die genauere Berechnung von f und führt zur Interpretation des zusätzlichen Streueffekts als den eines Hohlzylinders.

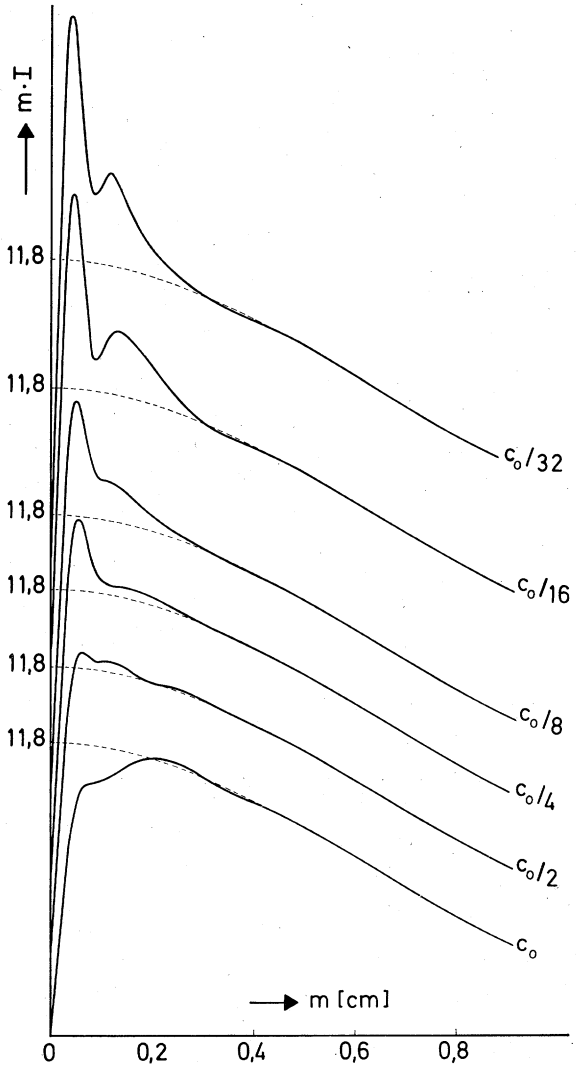


Abb. 4. Gemessene und entschmierte Querschnittstreukurven der reinen DNS für alle gemessenen Konzentrationen. Der Außenteil wird nach innen als GAUSSsche Kurve fortgesetzt (gestrichelte Linien). c_0 = 1,44 g/100 ml

Die Berechnung gestaltet sich wie folgt: die nach (1) berechneten I·m-Werte sind in Abb. 5 nur bis zu einem innersten Punkt eingezeichnet, von dem aus man den weiteren Verlauf nach einer GAUSSschen Form anneh-

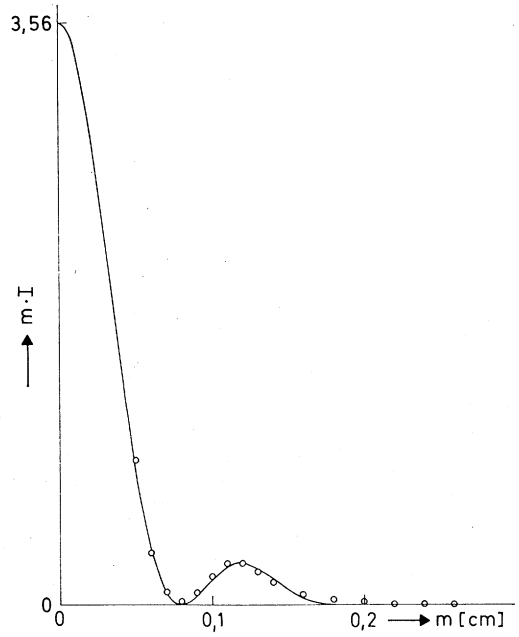


Abb. 5. Aus Abb. 4 durch Amplitudenzerlegung erhaltene Streukurve der Ionenhülle. Kreise: gemessen; ausgezogene Kurve: theoretische Querschnittsstreukurve eines Hohlzylinders mit $r_i/r_a = 0{,}4$; $r_i = 80$ Å; $r_a = 200$ Å

men kann. Um diese bis zum Winkel Null festzulegen, braucht man den Querschnitts-Streumassenradius, der dieser Reststreukurve entspricht. Er ist durch Kombination zweier Ansätze zu erhalten.

1. Für den Intensitätsfaktor f gilt die Beziehung

$$\sqrt{(I \cdot m)_{0,\mathrm{DNS}} \cdot f} - \sqrt{(I \cdot m)_{0,\mathrm{DNS}}} = \sqrt{(I \cdot m)_{0,\mathrm{Hülle}}} \tag{2a}$$

Da gemäß Abb. 4 $(I \cdot m)_{0,\mathrm{DNS}} = 11{,}8$ ist, gilt

$$\sqrt{11{,}8 \cdot f} - \sqrt{11{,}8} = \sqrt{(I \cdot m)_{0,\mathrm{Hülle}}} \tag{2b}$$

Aus dem zunächst unbekannten $(I \cdot m)_{0,\mathrm{Hülle}}$ und den Koordinaten des innersten, in Abb. 5 eingezeichneten Punktes $m = 0{,}05$ cm und $I \cdot m = 0{,}960$ können wir unter der Annahme, daß der innerste Meßpunkt bereits im GUINIERschen Bereich liegt, unter Verwendung der Beziehung für

$$R_q = 0{,}526a \sqrt{\operatorname{tg} \alpha} \quad (a = 20{,}2 \text{ cm}) \tag{3}$$

den Streumassenradius $R_{q,\text{Hülle}}$ ansetzen:

$$R^2_{q,\text{Hülle}} = 0{,}526^2 \cdot 20{,}2^2 \; \frac{\log (I \cdot m)_{0,\text{Hülle}} - \log 0{,}960}{0{,}05^2} \tag{4}$$

2. Zu einer Beziehung für R_q kann man auch auf folgende Art gelangen. Die Höhe h des Nebenmaximums relativ zum Hauptmaximum hängt wie folgt von seiner experimentell gefundenen Intensität 0,285 (vgl. Abb. 5) und vom Faktor f ab:

$$h = \frac{0{,}285}{(I \cdot m)_{0,\text{Hülle}}} = \frac{0{,}285}{(\sqrt{11{,}8\, f} - \sqrt{11{,}8})^2} \tag{5}$$

Nun ist andererseits bei Zugrundelegung eines Hohlzylinders für jeden h-Wert durch die theoretischen Kurven ein bestimmtes Radienverhältnis $\gamma = r_i/r_a$ festgelegt. Mit diesem und dem Außenradius r_a hängt der Streumassenradius $R_{q,\text{Hülle}}$ wie folgt zusammen:

$$R^2_{q,\text{Hülle}} = \frac{r_a^2}{2} (1 + \gamma^2) \tag{6}$$

Nun trägt man h in Abhängigkeit von γ für die theoretischen Hohlzylinderkurven auf (Abb. 6). Dann werden aus (5) für eine Reihe von f-Werten

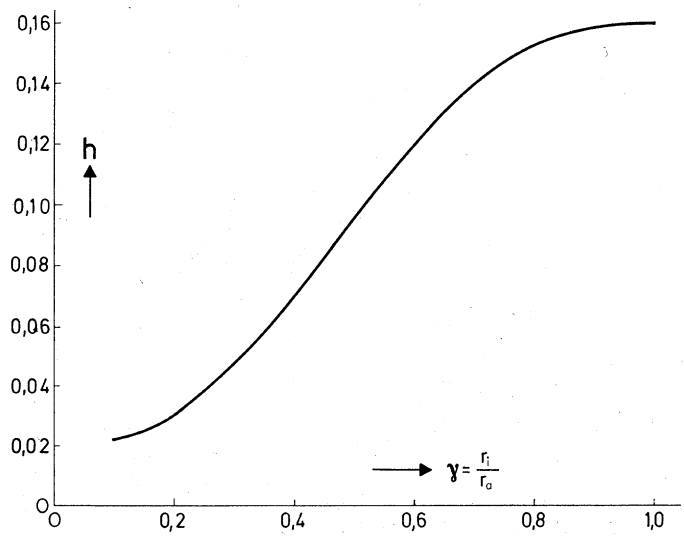


Abb. 6. Zusammenhang zwischen der relativen Höhe des ersten Nebenmaximums h und dem Radienverhältnis $\gamma = r_i/r_a$ für die Querschnittsstreukurven von Hohlzylindern

die zugehörigen h-Werte entnommen und die diesen entsprechenden γ-Werte mittels Abb. 6 bestimmt. Somit ist der Zusammenhang zwischen f und γ kurvenmäßig gegeben (wir verzichten auf die Darstellung). Dann wird für die theoretischen Streukurven der Zusammenhang zwischen

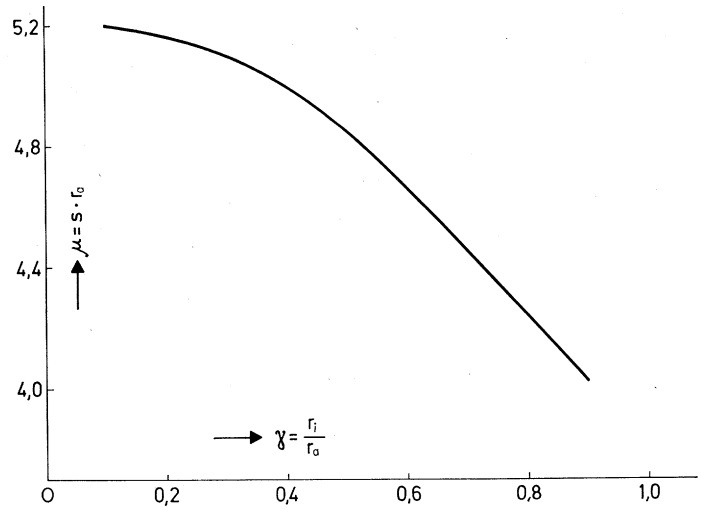


Abb. 7. Zusammenhang zwischen μ (= Abszisse der theoretischen Streukurven) und dem Radienverhältnis $\gamma = r_i/r_a$ für die Querschnittsstreukurven von Hohlzylindern

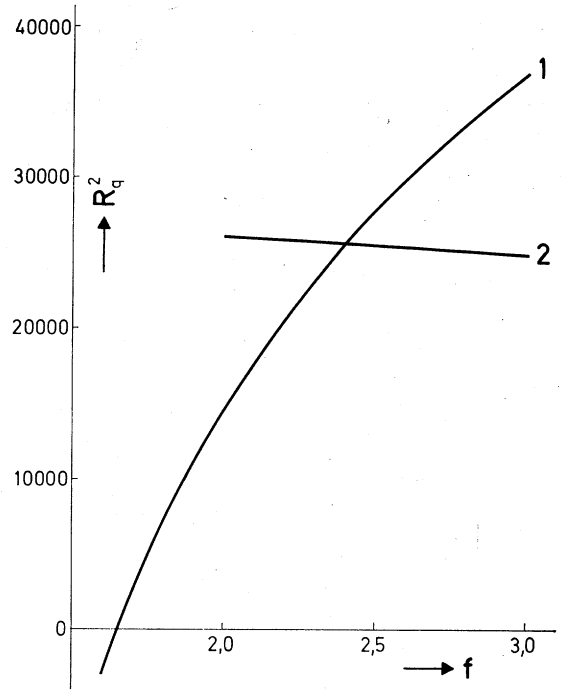
$\mu = s \cdot r_a$ des Nebenmaximums und dem zugehörigen γ-Wert dargestellt (Abb. 7). Jetzt hat man das Verhältnis der Skalenwerte der experimentellen und theoretischen Kurven zu bestimmen gemäß

$$\mu = s \cdot r_a = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \frac{m}{a} \cdot r_a \tag{7a}$$

Beziehen wir die Gleichung auf die Lage des Nebenmaximums, so haben wir zu setzen $m = 0{,}118$ (Abb. 5), und μ bedeutet dann den Abszissenwert der Nebenmaxima in den theoretischen Streukurven:

$$r_a = \mu \frac{1{,}54 \cdot 20{,}2}{2\pi \cdot 0{,}118} = \mu \cdot 42{,}0 \tag{7b}$$

Jetzt wird die Ordinate von Abb. 7 mit dem Faktor 42,0 multipliziert, womit wir den Zusammenhang zwischen γ und r_a erhalten. Damit ist für jeden gewählten f-Wert ein bestimmter r_a-Wert ermittelt. Mittels Gl. (6) kann nunmehr $R_{q,\text{Hülle}}$ als Funktion von f dargestellt werden (Abb. 8, Kurve 2).



Zeichnet man in das gleiche Diagramm den Zusammenhang von $R_{q,Hülle}$ und f, wie im Falle 1 dargestellt, ein (Abb. 8, Kurve 1), so ergibt die Abszisse des Schnittpunktes den gesuchten f-Wert von 2,4. Der zugehörige Ordinatenwert ist

$$R^2_{q,Hülle} = 25\,600$$

$$R_{q,Hülle} = 160\ Å$$

Abb. 8. Kurve 1: Zusammenhang zwischen R_q^2 und f berechnet aus der Beziehung (3); Kurve 2: berechnet aus der Höhe des Nebenmaximums

Aus Abb. 6 entnehmen wir $\gamma = r_i/r_a = 0{,}44$, woraus wir mittels Gl. (6) finden $r_a = 207$ Å und mit $\gamma \ldots r_i = 91$ Å.

Wir können jetzt die Kurven in Abb. 5 über den innersten eingezeichneten Meßpunkt bis zum Streuwinkel Null mittels des bekannten R_q-Wertes fortsetzen und erhalten aus (2b) durch Einsetzen von f = 2,4 sofort den Nullwert $(I \cdot m)_{0,Hülle} = 3{,}56$.

Dieses Ergebnis läßt sich durch die Annahme einer breiten Hülle aus Gegen- und Beiionen deuten, welche jedes DNS-Molekül umgibt.

Es sei betont, daß diese Ionenhülle eine etwa 400 mal kleinere Elektronendichtendifferenz gegenüber dem Lösungsmittel aufweist als das DNS-Molekül, wie dies Abb. 9 anschaulich macht. Dies entspricht den oben dargestellten Ergebnissen der Amplitudenzerlegung.

Der Querschnittsstreumassenradius des Gesamtkomplexes R_q setzt sich aus dem Querschnitts-Streumassenradius des „Kerns" $R_{q,DNS}$ und dem der Ionenhülle $R_{q,Hülle}$ wie folgt zusammen:

$$R_q^2 = \frac{\sqrt{(I \cdot m)_{0,DNS}} \cdot R^2_{q,DNS} + \sqrt{(I \cdot m)_{0,Hülle}} \cdot R^2_{q,Hülle}}{\sqrt{(I \cdot m)_{0,DNS}} + \sqrt{(I \cdot m)_{0,Hülle}}} \qquad (8)$$

Mit den bereits bekannten Werten auf der rechten Seite dieser Beziehung erhalten wir sofort $R_q^2 = 9200$ und $R_q = 96$ Å.

Nun erst sind wir in der Lage, aus den experimentell gefundenen Streumassenradien von 148 Å für das unbeladene und 166,5 Å für das beladene

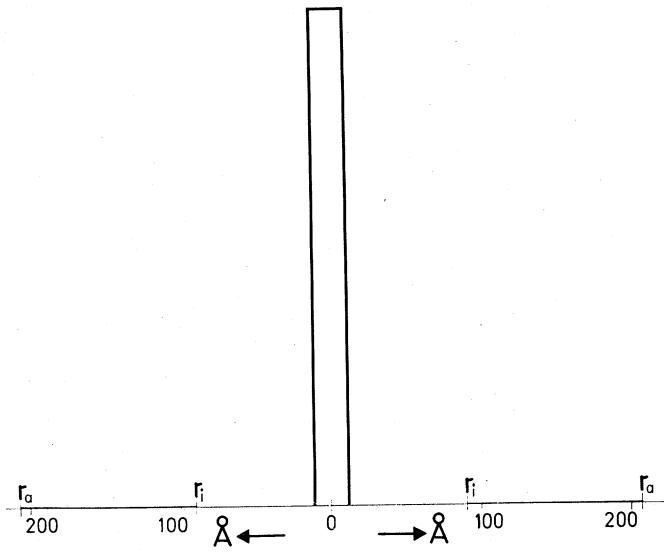


Abb. 9. Radiale Elektronendichtenverteilung um die Achse des DNS-Moleküls

DNS-Molekül, welche die Streumassenradien der DNS samt Ionenhülle darstellen, durch Berücksichtigung der Querschnittsstreumassenradien die tatsächliche Länge L der unbeladenen bzw. der beladenen DNS auszurechnen, mit:

$$R^2 - R_q^2 = L^2/12 \tag{9}$$

erhalten wir für das unbeladene Molekül sofort L = 388 Å. Bei den Querschnittsstreukurven der mit Actinomin beladenen DNS-Moleküle (Abb. 10) sieht man, daß die von der Ionenhülle hervorgerufene zusätzliche Streuung noch intensiver ist als bei den nicht beladenen Molekülen. Die Ursache dafür sind sicherlich in der Ionenhülle vorhandene zusätzliche Actinomin-Moleküle. Die Rekonstruktion des Innenteiles der Hüllenstreukurve kann für die beladenen Moleküle nicht in gleicher Weise wie oben durchgeführt werden, weil das Nebenmaximum nur sehr undeutlich ausgebildet ist. Wir haben daher, wie Abb. 11 zeigt, durch Kurvenver-

gleich eine optimale Anpassung zwischen der experimentell gegebenen Kurve und berechneten Querschnittsstreukurven von Hohlzylindern vorgenommen. Die Auswertung der so gefundenen Querschnittsstreukurve für ein Radienverhältnis $\gamma = r_i/r_a = 0{,}2$ ergibt einen Querschnittsstreumassenradius $R_q = 101$ Å und damit unter Berücksichtigung des gemessenen Streumassenradius $R = 166{,}5$ Å die Länge der mit Actinomin beladenen DNS-Moleküle $L = 458$ Å.

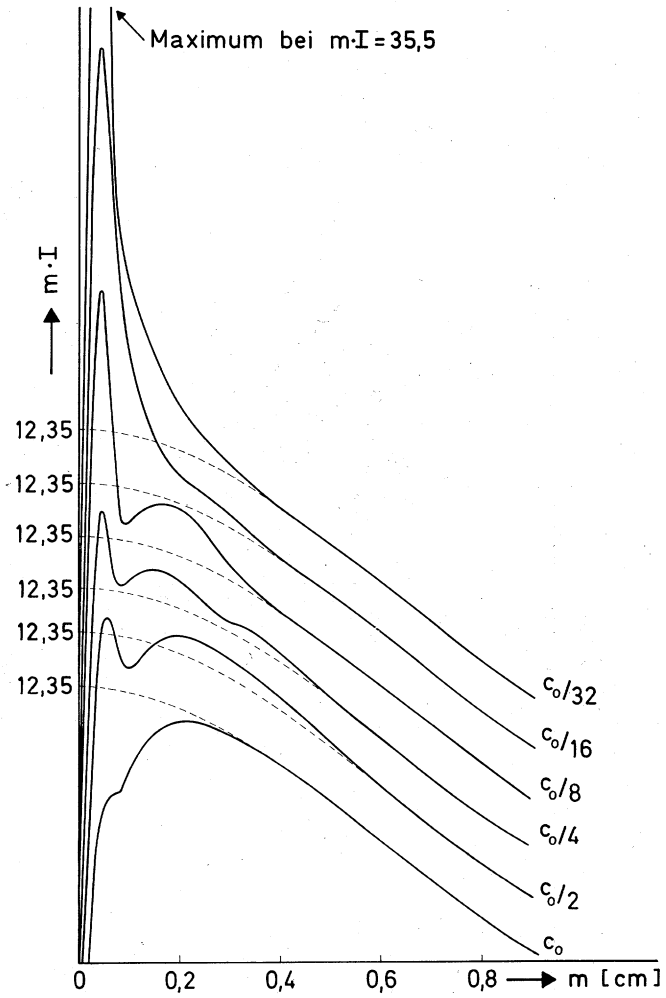


Abb. 10. Querschnittsstreukurven der beladenen DNS in Abhängigkeit von der Konzentration. Der Außenteil wurde als GAUSSsche Kurve nach innen fortgesetzt (strichlierte Linien)

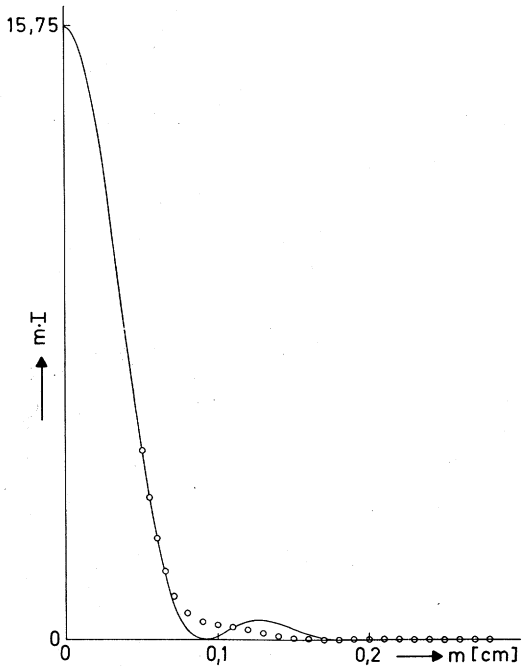


Abb. 11. Aus Abb. 10 (Kurve für $c_0/32$) durch Amplitutenzerlegung erhaltene Streukurve der Ionenhülle. Kreise: gemessen; ausgezogene Kurve: theoretische Querschnittsstreukurve eines Hohlzylinders $r_i/r_a = 0{,}2$; $r_i = 40$ Å; $r_a = 200$ Å

3. *Bestimmung der Querschnittsfaktoren ohne Ionenhülle und Berechnung des Beladungsgrades*

Wir wollen nun zur Diskussion des äußeren Teils der Querschnittskurven übergehen. Wir erhalten für den Querschnitts-Streumassenradius die Werte $R_q = 8{,}4$ für die reine Na-DNS und für $R_q = 8{,}0$ Å für das mit Actinomin beladene Molekül (Abb. 12). Wenn bei Bindung von Actinomin

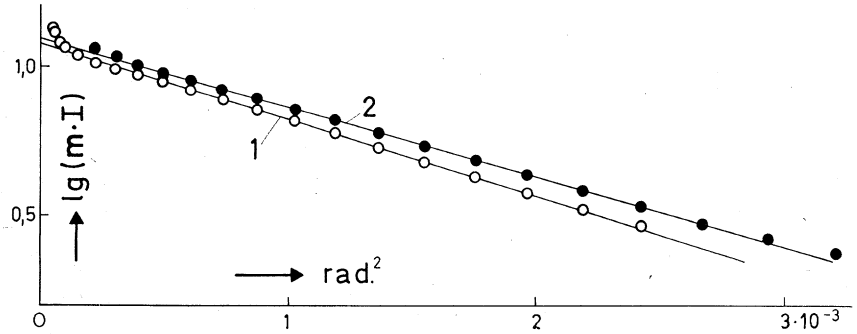


Abb. 12. Guinier-Auftragung des Querschnittsfaktors aus entschmierten Streukurven: 1. Na-Desoxyribonucleinsäure, 0,30 *m* NaCl, $R_{q,1} = 8{,}40$ Å; 2. Na-Desoxyribonucleinsäure + Actinomin, 0,30 *m* NaCl, $R_{q,2} = 8{,}0$ Å

der Querschnitts-Streumassenradius somit abnimmt, so wird man daraus, ohne genauere Diskussion, auf einen Einschub des Actinomins schließen. Nun muß man allerdings bedenken, daß das Molekül bei der Wechselwirkung länger wird; dadurch könnte ebenfalls eine Verkleinerung des Querschnitts zustande kommen. Machen wir die plausible Annahme, daß bei der Verlängerung das Volumen des DNS-Anteils konstant bleibt, so muß sich die Querschnittsfläche umgekehrt proportional mit der Verlängerung ändern. Diese Annahme führt auf eine Abnahme des Radius von 11,8 auf 11 Å und des Streumassenradius von 8,4 auf 7,8 Å. Da für die gestreckte und mit Actinomin (AM) beladene DNS der sehr ähnliche Wert von $R_q = 8{,}0$ Å gefunden wird, müssen wir schließen, daß die AM-Moleküle ungefähr in einem Abstand von der Längsachse des DNS-Moleküls angeordnet sind, der gleich dem Trägheitsradius ist (also im Abstand $r/\sqrt{2}$), ein Ergebnis, das nicht mit der Anlagerung des Actinomins außen am Molekül vereinbar ist.

Schließlich kann man die Querschnittskurven benützen, um die Zahl der gebundenen Actinomin-Moleküle zu berechnen. Der aus Abb. 12 ersichtliche Wert von $(I \cdot m)_0 = 11{,}80$ hat für die reine DNS auf ein Molekulargewicht pro Längeneinheit von 206/Å geführt. Der nach Beladung mit Actinomin und Verlängerung auftretende $(I \cdot m)_0$-Wert ist 12,35, wie Abb. 12 zeigt.

Um aus diesen Werten auf die Zunahme der Masse pro Längeneinheit und damit die gebundene AM-Menge zu kommen, stellen wir folgende Überlegung an. Durch die Streckung wird die Masse der DNS pro Längeneinheit von 206 auf $206 \cdot 388/458 = 174$/Å reduziert. Für die Masse pro Längeneinheit gilt nun die Beziehung[13,14,10]

$$M/Å = \frac{k(I \cdot m)_0 \cdot a}{P_0 \cdot c \cdot d(z_1 - \bar{v}_1 \rho_2)^2} \tag{10a}$$

a = Abstand Präparat-Registrierebene [cm]
d = Dicke des Präparats [cm]
P_0 = Primärintensität

Wenn wir die beim Versuch nicht variierenden Größen k, P_0, a und d in eine Konstante K zusammenfassen, so ist:

$$M/Å = K \frac{(I \cdot m)_0}{c(z_1 - \bar{v}_1 \rho_2)^2} \tag{10b}$$

und

$$K = \frac{(M/Å) \cdot c_{DNS} (z_1 - \bar{v}_1 \rho_2)^2}{(I \cdot m)_0} \tag{10c}$$

Wir wenden die Beziehung auf die im Komplex mit AM vorhandene reine DNS an. $(I \cdot m)_0$ erhalten wir dann aus dem oben angegebenen Wert von 11,80 nach Division durch den Dehnungsgrad 458/388 = 1,18, also $(I \cdot m)_0 = 11{,}80/1{,}18 = 10{,}0$. Die Masse pro Längeneinheit ist nach obigem M/Å = 206/1,18 = 174. Die Berechnung von z_1 erfolgte auf Grundlage der Basenzusammensetzung von Kalbsthymusnucleinsäure[21] zu $z_1 = 0{,}516$. Die Elektronendichte des Lösungsmittels ist $\rho_2 = 0{,}555$, so daß $(z_1 - \bar{v}_1\rho_2)^2 = 0{,}205^2$, also

$$K = \frac{1{,}74 \cdot c_{DNS} \cdot 0{,}205^2}{10{,}0}$$

Die gleiche Beziehung (10b) kann auch auf das an die DNS gebundene AM allein angewendet werden. Dazu muß man die nur vom AM herrührende Nullintensität des Querschnittsfaktors $(I \cdot m)_{0,AM}$ berechnen, was durch Amplitudenzerlegung möglich ist. Aus den Werten für die beladene DNS von 12,35 und dem DNS Anteil in diesem Komplex allein von 10,0 finden wir:

$$\sqrt{(I \cdot m)_{0,AM}} = \sqrt{12{,}35} - \sqrt{10{,}00} = \sqrt{0{,}122}$$

Somit ergibt sich nach (10b), wenn wir K einsetzen,

$$(M/Å)_{AM,geb} = \frac{1{,}74 \cdot c_{DNS} \cdot 0{,}205^2}{10{,}0} \cdot \frac{0{,}122}{c_{AM,geb} \cdot (z_1 - \bar{v}_1\rho_2)^2_{AM}}$$

Mit $z_{1,AM} = 0{,}538$, $\bar{v}_{1,AM} = 0{,}58$ und $\rho_2 = 0{,}555$ erhalten wir zunächst: $(z_1 - \bar{v}_1\rho_2)^2_{AM} = 0{,}216^2$. Nun wird das Konzentrationsverhältnis $c_{DNS}/c_{AM,geb}$ ersetzt durch das Verhältnis der Molekulargewichte pro Å. Den Wert für die DNS im gedehnten Zustand haben wir bereits zu 174 berechnet, so daß

$$c_{DNS}/c_{AM} = 174/(M/Å)_{AM,geb}$$

Durch Einsetzen obiger Beziehung erhalten wir:

$$(M/Å)^2_{AM,geb} = \frac{174^2 \cdot 0{,}205^2 \cdot 0{,}122}{10{,}0 \cdot 0{,}216^2}$$

$$(M/Å)_{AM,geb} = 18{,}3$$

Somit ergibt sich die Masse pro Längeneinheit für das gestreckte und beladene Molekül zu

$$174 + 18{,}3 = 192$$

Die Massenzunahme durch die Beladung wird also durch die Streckung überkompensiert.

14) O. Kratky und R. Breiner, Makromolekulare Chem. **25** (1958) 134; O. Kratky und H. Sembach, Makromolekulare Chem. **18/19** (1956) 463.
15) H. Stabinger, H. Leopold und O. Kratky, Mh. Chem. **98** (1967) 436; O. Kratky, H. Leopold und H. Stabinger, Z. angew. Physik **27** (1969) 273.
16) V. Luzzati, A. Nicolaieff und F. Mason, J. mol. Biol. **3** (1961) 185.
17) G. Cohen und H. Eisenberg, Biopolymere **4** (1966) 429.
18) G. Porod, Mh. Chem. **80** (1949) 251; O. Kratky und G. Porod, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **68** (1949) 1106.
19) Ch. Sadron und J. Pouyet, in: Veröff. d. vierten Internat. Kongresses f. Biochemie, Symp. IX, Pergamon Press, London–New York–Paris–Los Angeles. S. 52.
20) R. Litzler, Thèse, Strasbourg, 1967.
21) O. Kratky, I. Pilz, P. J. Schmitz und R. Oberdorfer, Z. Naturforsch. **18b** (1963) 180.

Aus dem Molekulargewicht des Actinomins von 524 folgt, daß beim Streckungsgrad 458/388 = 1,18 im Mittel an der gestreckten DNS etwa in Abständen von 524/18,3 = 28,6 Å die Actinominmoleküle gebunden sind. Da in der gestreckten DNS ein Basenpaar eine mittlere Länge von 3,4 · 1,18 = 4,01 Å besitzt, heißt dies, daß auf 28,6/4,01 = 7,14 Basenpaare ein Actinominmolekül kommt. Aus dem Abstand der Actinominmoleküle von 28,6 Å und der Länge in beladenem Zustand von 458 Å folgt, daß im Durchschnitt 16 Actinominmoleküle auf einem DNS-Molekül sitzen. Sie bewirken eine Verlängerung des ganzen Moleküls von 388 auf 458, d.i. um 70 Å, so daß jedes Actinominmolekül eine Verlängerung von 70/16 = 4,38 Å verursacht. Dieser Wert liegt im gleichen Bereich, wie er für den Actinomin-DNS-Komplex mittels hydrodynamischer Methoden gefunden wurde[7].

Der eine von uns (K.) dankt dem Department of Agriculture, United States, verbindlichst für die im Rahmen des Grants UR-E3-(60)-7, FG-Austria-101 gewährte Unterstützung und dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Österreich, für die Bereitstellung von apparativen Hilfsmitteln.

1) W. Kersten, H. Kersten und H. M. Rauen, Nature [London] **187** (1960) 60.
2) E. Harbers und W. Müller, Biochem. biophysic. Res. Commun. **7** (1962) 107.
3) G. Hartmann und U. Coy, Angew. Chem. **74** (1962) 501.
4) J. Hurwitz, J. J. Furth, M. Malamy und M. Alexander, Proc. nat. Acad. Sci. US. **48** (1962) 122.
5) I. H. Goldberg, M. Rabinowitz und E. Reich, Proc. nat. Acad. Sci. US. **48** (1962) 2094.
6) L. D. Hamilton, W. Fuller und E. Reich, Nature [London] **198** (1963) 538.
7) W. Müller und D. M. Crothers, J. molecular Biol. **35** (1968) 251.
8) R. W. Wells, Science N. Y. **165** (1969) 75.
9) L. S. Lerman, J. molecular Biol. **3** (1961) 18.
10) O. Kratky, Progr. in Biophysics **13** (1963) 105.
11) O. Kratky, in: Proc. Conf. at Syracuse University 1965 on Small-Angle X-Ray Scattering ed. by H. Brumberger, Gordon and Breach, Sci. Publishers New York, London, Paris 1967.
12) O. Kratky, G. Porod und Z. Skala, Acta physica austriaca **13** (1960) 76.
13) O. Kratky und G. Porod, in: Die Physik der Hochpolymeren, II, herausgg. von H. A. Stuart, Springer-Verlag Berlin–Göttingen–Heidelberg 1953; O. Kratky, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. **60** (1956) 245.

14) O. Kratky und R. Breiner, Makromolekulare Chem. **25** (1958) 134; O. Kratky und H. Sembach, Makromolekulare Chem. **18/19** (1956) 463.
15) H. Stabinger, H. Leopold und O. Kratky, Mh. Chem. **98** (1967) 436; O. Kratky, H. Leopold und H. Stabinger, Z. angew. Physik **27** (1969) 273.
16) V. Luzzati, A. Nicolaieff und F. Mason, J. mol. Biol. **3** (1961) 185.
17) G. Cohen und H. Eisenberg, Biopolymere **4** (1966) 429.
18) G. Porod, Mh. Chem. **80** (1949) 251; O. Kratky und G. Porod, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **68** (1949) 1106.
19) Ch. Sadron und J. Pouyet, in: Veröff. d. vierten Internat. Kongresses f. Biochemie, Symp. IX, Pergamon Press, London–New York–Paris–Los Angeles. S. 52.
20) R. Litzler, Thèse, Strasbourg, 1967.
21) O. Kratky, I. Pilz, P. J. Schmitz und R. Oberdorfer, Z. Naturforsch. **18b** (1963) 180.

Aus dem Molekulargewicht des Actinomins von 524 folgt, daß beim Streckungsgrad 458/388 = 1,18 im Mittel an der gestreckten DNS etwa in Abständen von 524/18,3 = 28,6 Å die Actinominmoleküle gebunden sind. Da in der gestreckten DNS ein Basenpaar eine mittlere Länge von 3,4 · 1,18 = 4,01 Å besitzt, heißt dies, daß auf 28,6/4,01 = 7,14 Basenpaare ein Actinominmolekül kommt. Aus dem Abstand der Actinominmoleküle von 28,6 Å und der Länge in beladenem Zustand von 458 Å folgt, daß im Durchschnitt 16 Actinominmoleküle auf einem DNS-Molekül sitzen. Sie bewirken eine Verlängerung des ganzen Moleküls von 388 auf 458, d.i. um 70 Å, so daß jedes Actinominmolekül eine Verlängerung von 70/16 = 4,38 Å verursacht. Dieser Wert liegt im gleichen Bereich, wie er für den Actinomin-DNS-Komplex mittels hydrodynamischer Methoden gefunden wurde[7].

Der eine von uns (K.) dankt dem Department of Agriculture, United States, verbindlichst für die im Rahmen des Grants UR-E3-(60)-7, FG-Austria-101 gewährte Unterstützung und dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Österreich, für die Bereitstellung von apparativen Hilfsmitteln.

1) W. Kersten, H. Kersten und H. M. Rauen, Nature [London] **187** (1960) 60.
2) E. Harbers und W. Müller, Biochem. biophysic. Res. Commun. **7** (1962) 107.
3) G. Hartmann und U. Coy, Angew. Chem. **74** (1962) 501.
4) J. Hurwitz, J. J. Furth, M. Malamy und M. Alexander, Proc. nat. Acad. Sci. US. **48** (1962) 122.
5) I. H. Goldberg, M. Rabinowitz und E. Reich, Proc. nat. Acad. Sci. US. **48** (1962) 2094.
6) L. D. Hamilton, W. Fuller und E. Reich, Nature [London] **198** (1963) 538.
7) W. Müller und D. M. Crothers, J. molecular Biol. **35** (1968) 251.
8) R. W. Wells, Science N. Y. **165** (1969) 75.
9) L. S. Lerman, J. molecular Biol. **3** (1961) 18.
10) O. Kratky, Progr. in Biophysics **13** (1963) 105.
11) O. Kratky, in: Proc. Conf. at Syracuse University 1965 on Small-Angle X-Ray Scattering ed. by H. Brumberger, Gordon and Breach, Sci. Publishers New York, London, Paris 1967.
12) O. Kratky, G. Porod und Z. Skala, Acta physica austriaca **13** (1960) 76.
13) O. Kratky und G. Porod, in: Die Physik der Hochpolymeren, II, herausgg. von H. A. Stuart, Springer-Verlag Berlin–Göttingen–Heidelberg 1953; O. Kratky, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. **60** (1956) 245.