

## Nachweis der Ausbildung übermolekularer Teilchen in Lösungen von *DNA* durch Messung der Lichtstreuung und Viskosität

Erich Gruber\*, Rosel Gruber und Josef Schurz\*\*

\* Institut für Makromolekulare Chemie, Technische Hochschule Darmstadt,  
D-6100 Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland  
Sonderforschungsbereich 41 „Chemie und Physik der Makromoleküle“ Mainz-  
Darmstadt

\*\* Institut für Physikalische Chemie, Universität Graz, A-8010 Graz,  
Österreich

(Eingegangen 10. Januar 1978. Angenommen 23. Januar 1978)

*Studies on the Formation of Supermolecular Particles in Solutions of DNA by  
Means of Light Scattering and Rheological Methods*

Buffered solutions of various preparations of calves thymus and salmon sperm resp. were investigated by optical and rheological methods. The fine structure of measured  $P(\Theta)$ -light scattering functions was interpreted as being caused by large supermolecular particles in solution. These could be analysed by use of the Rayleigh-Gans-theory and were found to have low density and to be very sensitive against temperature and shear. Number and size of supermolecular particles in *DNA*-solutions increase steadily when the solutions are allowed to rest for some days.

### Einleitung

Es ist bekannt, daß Lösungen von isolierter *DNA* in ionenhaltigem, wäßrigem Milieu gegen Wärme, Bestrahlung, Scherung und chemische Einflüsse empfindlich sind. Die *DNA*-Moleküle können durch mechanische oder hydrolytische Kettenspaltung irreversibel geschädigt, und sie können bezüglich ihrer Tertiärstruktur verändert werden. Unsere eigenen Beobachtungen an verschiedenen *DNA*-Lösungen deuten darauf hin, daß sich auch beim längeren Stehenlassen unter Licht- und Luftausschluß schon bei Raumtemperatur zusätzlich langsame Veränderungen in den Lösungen abspielen, die man am besten als einen übermolekularen Aggregationsprozeß deuten kann. Die Alterung der

Lösung gibt sich unter anderem durch Änderung der Lichtstreuung, des Brechungsindex, der Streulichtdepolarisation und der rheologischen Eigenschaften zu erkennen.

Das Lichtstreuvermögen einer Lösung wird besonders stark durch die Anwesenheit großer, übermolekularer Teilchen beeinflußt, weil die Streuintensität direkt proportional der Teilchenmasse ist und die Winkelfunktion des Streulichts stark von der Teilchengröße abhängt. Es gilt:

$$\lim_{c \rightarrow 0} \Delta I = K \left( \frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \cdot c \cdot M \cdot P(\Theta) \quad (1)$$

$$\Delta I = I - I_1$$

$I$  Streuung der Lösung,  $I_1$  Streuung des Lösungsmittels,  $c$  Konzentration,  $M$  Molmasse,  $\frac{\partial n}{\partial c}$  Brechungsindexinkrement,  $K$  universelle Konstante,  $P(\Theta)$  Streufunktion.

Enthält die Lösung Teilchensorten verschiedener Masse, liefert die Streuintensität das Massenmittel  $M_W = \sum W_i M_i$  ( $W_i$  Massenanteil der Teilchensorte mit der Molmasse  $M_i$ ).

Sind alle Teilchen gegen die Lichtwellenlänge klein, gilt für  $P(\Theta)$  nach *Guinier*<sup>1</sup> die Näherung:

$$P(\Theta) \approx e^{-\frac{S^2 h^2}{3}} \quad (2)$$

$$h \approx \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\Theta}{2}$$

$\lambda$  Lichtwellenlänge in der Lösung,  $\Theta$  Streuwinkel,  $S$  Streumassenradius.

$$\ln P(\Theta) \approx -\frac{1}{3} S^2 \cdot h^2 \quad (2a)$$

Bei größeren Teilchen findet man eine nicht monotone Streufunktion  $P(\Theta) = f(h^2)$ .

Enthält die Lösung Teilchensorten verschiedener Größe, ergibt sich die Streufunktion als algebraische Summe aller Einzelstreufunktionen.

Abb. 1 zeigt die theoretischen Streufunktionen zweier Lösungen, die neben einer kleinen Teilchensorte (Masse  $m_I$ , Äquivalentkugelradius  $R_I$ ) eine gleich große Masse an großen übermolekularen Teilchen enthalten. Die Streufunktionen wurden für Äquivalentkugeln nach *Rayleigh*<sup>2</sup> und *Gans*<sup>3</sup> berechnet [Formel (3)]:

$$P(\Theta) = \left[ \frac{3}{u^2} (\sin u - u \cos u) \right]^2 \quad (3)$$

$$u = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot D \cdot \sin \frac{\Theta}{2}$$

$D$  Durchmesser der Äquivalentkugel.

Diese einfache Beziehung lässt sich am besten für übermolekulare Gelpartikel verwenden, weil bei diesen die der Rechnung zugrunde gelegten Voraussetzungen (geringe Brechungsindexdivergenz, keine Totalreflexion an der Teilchenperipherie) recht gut erfüllt sind. Aus der Lage der Extremwerte kann man nach (4) näherungsweise die Durchmesser der großen Teilchen berechnen<sup>4</sup>:

$$h_e = \frac{\pi}{D} (N + 0,89) \quad (4)$$

$N$  Ordnungszahl des Extremwertes,  $h_e$  Winkellage des Extremwertes.

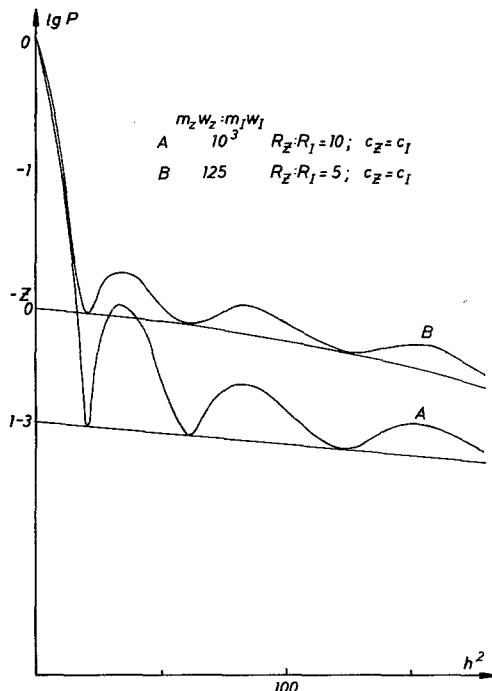


Abb. 1. Theoretische Streufunktion einer Modell-Lösung aus Makromolekülen (Index I) und übermolekularen Gelteilchen (Index Z) unter Zugrundelegung streuungsgäquivalenter Kugeln berechnet nach Rayleigh-Gans

Eine nicht zu große Uneinheitlichkeit bezüglich Teilchenmasse und Größe innerhalb einer Gruppe (aggregierte bzw. nicht aggregierte Teilchen) hat demgegenüber nur einen geringen Einfluß auf die Form der Lichtstrefufunktion.

Die Lösungsviskosität spricht weniger deutlich auf das Vorhandensein übermolekulärer Teilchen an, weil sie nur von der hydrodynamisch wirksamen Teilchendichte abhängt. Nur beim Auftreten sehr lockerer und/oder stark anisotroper Gelpartikel findet man eine deutliche Viskositätszunahme. Einen direkten Hinweis auf die Teilchengröße liefert dagegen die Scherabhängigkeit der Viskosität (Fließkurve oder Fließfunktion). Aus einem Vergleich zwischen

gemessenen und theoretisch berechneten Fließkurven kann man die Rotationsdiffusionskonstante  $D_R = \xi/kT$  ( $\xi$  Rotationsreibungsfaktor) und das Achsenverhältnis  $p = a/b$  von strömungsäquivalenten Rotationsellipsoiden ermitteln<sup>4,6</sup>.

## Experimenteller Teil

### Untersuchte Substanzen und Herstellung der Lösungen

Es wurden eine Reihe verschiedener Proben von Lachsspermien- und Kalbsthymus-DNA untersucht. Die DNA-Proben, die hier mit den Buchstaben A—F bezeichnet sind, wurden entsprechend ihrer Herkunft verschieden vorbehandelt:

**A:** Bei diesen Proben handelte es sich jeweils um hochmolekulare Lachsspermien-DNA der Firma Calbiochem. Die leicht löslichen Proben wurden bei 5 °C unter Luft- und Lichtausschluß in Phosphatpuffer gelöst (0,5 M-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O, 0,25 M-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 M-Na<sub>2</sub>EDTA · 2 H<sub>2</sub>O).

**B:** Diese Proben waren mit Probe A herkunftsgleich, sie wurden jedoch vor dem Lösen mehrere Monate im trockenen Zustand im Kühlschrank gelagert. Die gelagerte Substanz war weniger gut löslich, bei der Lösung wurde in gleicher Weise verfahren wie bei DNA-A.

**C:** Diese Substanz wurde von *H. Tritthart*<sup>7</sup> gelöst und vermessen. Es handelte sich um eine Kalbsthymus-DNA der Firma Laboratories, New York. Die Substanz war vor Inangriffnahme der Messungen einige Monate im Kühlschrank gelagert worden. Sie wurde dann bei niedriger Temperatur in einem hochverdünnten Puffer gelöst (0,01 M-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 10 H<sub>2</sub>O, 0,005 M-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,001 M-Na<sub>2</sub>EDTA · 2 H<sub>2</sub>O, pH = 7,07). Die Konzentration der Lösung war nie größer als 0,01—0,1 g cm<sup>-3</sup>, Lösezeit der Lösung war mindestens drei Tage, in manchen Fällen viel länger.

**D:** Mit Chloroform stabilisierte Lösung von Kalbsthymus-DNA (Firma Boehringer, Mannheim, Kat.-Nr. 15130). Die Konzentration dieser Stammlösung betrug  $2,94 \cdot 10^{-3}$  g cm<sup>-3</sup>. Das Molekulargewicht lag nach den Angaben des Herstellers zwischen 1,0 und  $1,2 \cdot 10^7$ . Der spezifische, dekadische Extinktionskoeffizient wurde bei der nativen Lösung im Maximum der Absorptionskurve ( $\lambda = 260$  nm) zu  $1,70 \cdot 10^4$  cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> gemessen. Nach Denaturierung und Zusatz von 0,1 N-NaOH bis pH = 12,0 stieg dieser Wert auf  $2,19 \cdot 10^4$  cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> an. Dies entspricht einer Hypochromizität der ursprünglichen Lösung von 22 %. Die Stammlösung wurde mit NaCl-haltigem Phosphatpuffer (pH = 7,2) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die so hergestellte Lösung war 0,025 M an Phosphat und 0,2 M an NaCl. Zur Entfernung des Chloroforms und Herstellung des osmotischen Gleichgewichts wurde die Lösung anschließend bei 5 °C einige Male gegen eine Pufferlösung (0,025 M-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, 0,2 M-NaCl) dialysiert. Die letzte Dialyselösung diente bei den anschließenden Messungen der UV-Absorption, des Brechungssinkments und der Lichtstreuung als Vergleichslösung.

**E:** Ein Teil der Stammlösung lagerte vier Wochen bei 4 °C. Diese gealterte Lösung, hier DNA-E genannt, wurde in gleicher Weise dialysiert, entstaubt und vermessen wie DNA-D.

**F:** Bei dieser Probe handelte es sich um eine Kalbsthymus-DNA in 0,01 N NaCl, deren Molekulargewicht durch kurzzeitige Behandlung mit Ultraschall verringert und vereinheitlicht worden war. Das Präparat wurde uns freundlicherweise von Prof. *U. Hagen*, Institut für Strahlenbiologie am Kernforschungszentrum Karlsruhe, zur Verfügung gestellt (Präparation nach *Kay* et

al.<sup>8</sup>). Die Lösung hatte eine Konzentration von  $3,12 \cdot 10^{-4} \text{ g cm}^{-3}$ . Eine Sedimentationsanalyse des Herstellers ergab ein  $S^\circ = 9,35$ , ein  $M_w = 720\,000$  und einen Staudinger-Index von  $[\eta] = 9,10 \cdot 10^3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Die spezifischen Extinktionskoeffizienten wurden für die native Substanz zu  $2,19 \cdot 10^4 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$  für die pH-denaturierte Probe zu  $3,42 \cdot 10^4 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$  bestimmt. Dies entspricht einer Hypochromizität von 36 %. Bei einer Überprüfung der Substanz nach der Entstaubung durch Filtration wurde keine wesentliche Änderung der charakteristischen Kenngrößen festgestellt.

**G**: Dieses Präparat war eine Kalbsthymus-*DNA*, die in gleicher Weise wie *DNA-F* hergestellt, aber nicht durch Ultraschallbehandlung verändert worden war. Es wurde uns ebenfalls von Prof. *U. Hagen*, Institut für Strahlenbiologie am Kernforschungszentrum Karlsruhe, zur Verfügung gestellt. Die Kalbsthymus-*DNA* war bereits in  $0,01 \text{ M}$ -NaCl-Lösung gelöst. Angaben des Herstellers: Sedimentationsanalyse:  $S_{20, w, c}^2 = 24,2 \text{ S}$ ; Molekulargewicht:  $M_w \approx 1,6 \cdot 10^7$ .

#### *Entstaubung der Lösungen*

Die zur Messung der Lichtstreuung erforderliche Entstaubung erfolgte durch Feinfiltration unter Kühlung ( $\approx 5^\circ\text{C}$ ), Lichtausschluß und mit möglichst geringem treibenden Druck. Es fanden G 5 f-Glassinterfilter und Millipore- und Nucleopore-Membranfilter Verwendung (Porenweite  $0,5 \mu\text{m}$ ). Die Lösungen wurden direkt in die zuvor entstaubte und versiegelte Kuvette filtriert. Viskosere Lösungen wurden zuerst durch G 2-Glasfilter vorgereinigt und anschließend staubfrei gemacht. Der Konzentrationsverlust in der ersten Filtrationsstufe betrug bis zu 20 %, in der zweiten Stufe bis zu 12 %.

Das Lösungsmittel wurde jeweils durch Filtration mit Membranfiltern ( $0,22 \mu\text{m}$  Porenweite) staubfrei gemacht.

#### *Konzentrationsbestimmung*

Die Konzentration der filtrierten Lösungen wurde bei den Proben **A—C** durch Eindampfen der Lösungen und des Puffers aus einer Differenzwägung ermittelt.

Bei den Proben **D—F** wurde diese durch Messung der UV-Absorption festgestellt. Dazu wurde die Probelösung durch Titration mit NaOH auf  $\text{pH} = 12,0$  denaturiert und das UV-Spektrum gegen eine Lösung gleicher Ionenkonzentration vermessen. Aus der gemessenen Extinktion wurde mit Hilfe des gesondert bestimmten spezifischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon' = 2,19 \cdot 10^4 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$  die Konzentration errechnet.

#### *Messung des Brechungskrements*

Die Brechungsindexdifferenz  $\Delta n = n - n_1$  zwischen Lösung ( $n$ ) und Lösungsmittel ( $n_1$ ) wurde in einem Brice-Phoenix-Differentialrefraktometer bzw. in einem Zeiss-Interferometer (Kammerlänge 2 cm) bei  $25^\circ\text{C}$  bestimmt. Die Geräte waren mit KCl-Standardlösungen geeicht.

#### *Messung der Lichtstreuung*

Die Messungen der Substanz **C** wurden an einem teilweise modifizierten Brice-Phoenix-Lichtstreuophotometer von *H. Tritthart*<sup>7</sup> durchgeführt. Die Lichtstreuungsmessungen der anderen Proben wurden an einem Gerät FICA

PGD 42000 vorgenommen, wobei die Streufunktion im Bereich  $30^\circ \leq \theta \leq 150^\circ$  in Intervallen von  $2,5^\circ$  vermessen wurde.

Das Meßsignal wurde graphisch aufgezeichnet und geglättet. Verwendete Lichtwellenlängen: 436 und 546 nm.

### *Viskositätsmessungen*

Die Viskosität der Lösungen wurde in *Ubbelohde*-Kapillarviskosimetern (mittlere Scherrate je nach Viskosität der Lösung  $700$ — $1200 \text{ s}^{-1}$ ) oder in einem *Zimm-Chrothers*-Schwimm-Rotationsviskosimeter (mittlere Scherrate  $0,018$ — $0,040 \text{ s}^{-1}$ ) gemessen. Zur Bestimmung des *Staudinger*-Index  $[\eta]$  wurde die reduzierte Viskosität  $\eta_{\text{red}} = \eta_{\text{sp}}/c$  graphisch auf verschwindende Konzentration extrapoliert.

## **Ergebnisse und Diskussion**

### **I. Optische Messungen**

An allen Proben wurde die Winkelabhängigkeit des Streulichts sehr genau als Funktion der Konzentration und der Lagerungsdauer der Lösung vermessen. Die Form der gefundenen Streufunktionen fiel dabei sehr unterschiedlich aus. In Abb. 2 werden einige willkürlich ausgewählte Beispiele von frisch vermessenen, in Abb. 3 von gelagerten Lösungen angegeben. Die Streufunktion hängt von der Art der Probe, der Konzentration, dem Ionenmilieu, dem Alterungszustand und dem Nativitätsgrad ab. So unterschiedlich die Form der Streufunktion im einzelnen auch ist, man erkennt in jedem Fall eine nicht monotone Feinstruktur, die mitunter sogar dominiert. Reine Knäuel- oder Stäbchenstreufunktionen konnten von uns nur in Ausnahmefällen festgestellt werden. Trotz sehr vieler Messungen haben wir nicht genügend viele derartige Streufunktionen erhalten, um sie zuverlässig auswerten zu können. Dies mag daran liegen, daß wir sehr große Sorgfalt auf die Entstaubung der Lösungen legten und die Lösungen daher beim Vermessen nicht mehr ganz frisch waren. Wie aus Abb. 4 und 5 hervorgeht, bildet sich nach der Entstaubung die Überstruktur beim Stehen in der Küvette aus. *Krasna*<sup>9</sup> und *Kirste*<sup>10</sup> berichten über *DNA*-Streufunktionen, die sich sehr gut mit Hilfe der Stäbchenstreufunktion beschreiben lassen.

Als Ursache für die von uns gefundenen ungewöhnlichen Streufunktionen können drei verschiedene Arten von Überstrukturen in der Lösung vermutet werden:

1. Überknäuel mit Krümmungspersistenz,
2. Lösungsfernordnungen in einer Art flüssig kristalliner Phase,
3. großvolumige Multimerisate.

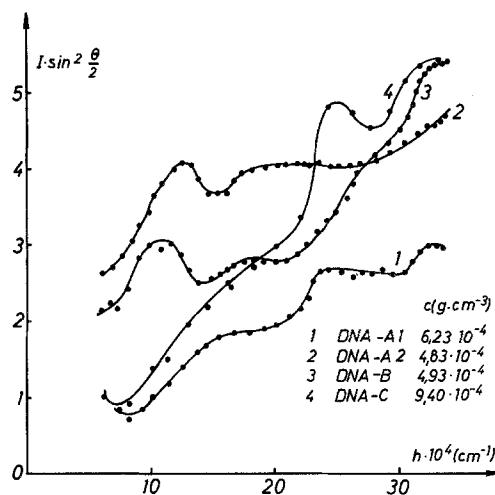


Abb. 2. Streufunktion verschiedener *DNA*-Lösungen (Proben **A**, **B**, **C**), in der Auftragung  $I \sin \frac{\Theta}{2}$  vs.  $\sin \frac{\Theta}{2}$ , unmittelbar nach Herstellung der Lösungen

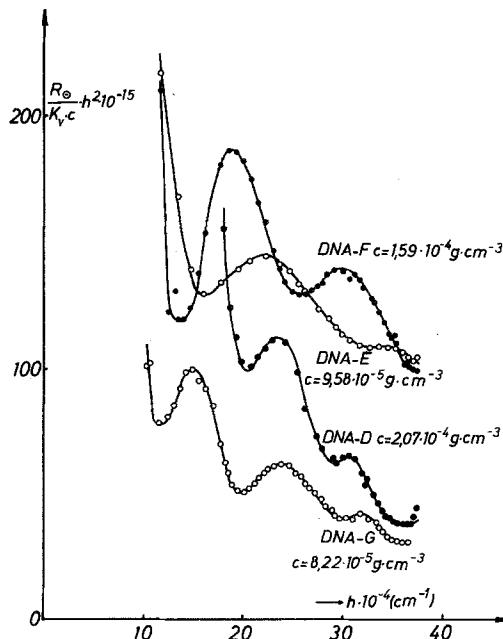


Abb. 3. Wie Abb. 2 für die Proben **D**, **E**, **F**, **G** nach Lagerung;  $h = (4 \pi / \lambda) \sin \frac{\Theta}{2}$

### 1. Zur Interpretation der Streufunktion als Folge von Überknäueln

Wie in einer früheren Mitteilung<sup>11</sup> gezeigt, lässt sich eine in der Auftragung  $I \cdot h^2$  vs.  $h$  stufenförmige Streufunktion als Folge einer knäuelartigen Tertiärstruktur interpretieren, die sich aus aufgedrillten, lockeren und aus starren, intakten doppelhelicalen Bereichen aufbaut.

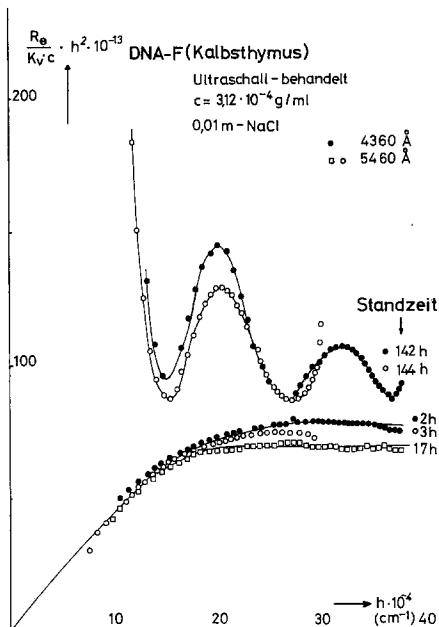


Abb. 4. Ausbildung einer nichtmonotonen Streufunktion beim Lagern der Lösung in der Küvette (DNA-F,  $c = 3,12 \cdot 10^{-4} \text{ g cm}^{-3}$ )

Die von *Feodorov, Birshtein* und *Pitzyn*<sup>12</sup> für unendlich lange Moleküle erhaltenen Ergebnisse wurden von uns für den Fall von Segmentketten endlicher Länge erweitert<sup>13</sup>. Es wurde gefunden, daß in der Streukurve bei einem Winkel  $\beta^*$  ein  $\Theta^{-2}$ -Abschnitt der Streukurve beginnt (Anfang eines abszissenparallelen Abschnitts in der Auftragung  $I \cdot h^2$  vs.  $h$ ). Für  $\beta^*$  gilt

$$\lg \beta^* = 0,5 - 0,45 \lg N \quad (5)$$

( $\beta = \frac{4\pi}{\lambda} A \cdot \sin \frac{\Theta^*}{2}$ ; \* Knickpunkt;  $A$  Segmentlänge,  $N$  Segmentzahl der Zick-Zack-Kette.)

Daraus folgt für die Segmentlänge  $A$ :

$$\lg A = 0,497 - 0,454 N - \lg h^* \quad (6)$$

Wenn man die Gelenkabschnitte der Kette als punktförmig annimmt, gilt  $A \cdot N = L$  ( $L$  Konturlänge des Superknäuels). Kennt man die Konturlänge — etwa aus dem Molekulargewicht und den Dimensionen

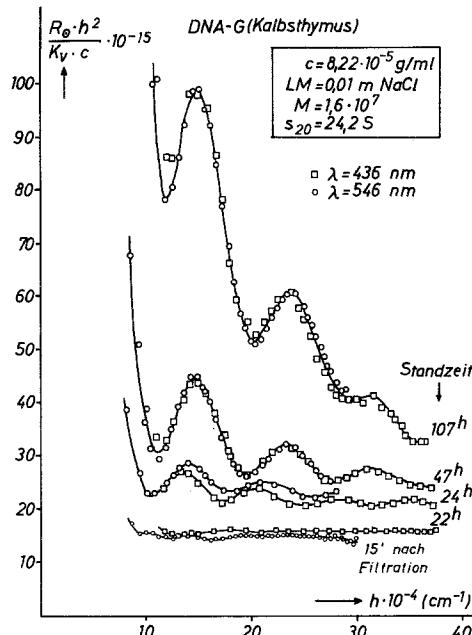


Abb. 5. Wie Abb. 4 für DNA-G,  $c = 8,22 \cdot 10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$

der Grundeinheit —, kann man aus der Lage des Knickpunktes nach Gl. (6) die Segmentlänge berechnen.

Ein Streukurventyp von DNA-Lösungen erinnert in der Tat an die Streukurve eines kurzen Überknäuels (siehe Abb. 2). Es wurde auch versucht, die Lage des Knickpunktes zur Ermittlung der charakteristischen Knäuelparameter heranzuziehen<sup>11</sup>. Dabei ergaben sich für teilweise denaturierte DNA-Proben durchaus plausible Werte. Für die hier angeführte Probe B ergab sich:  $A = 106,0 \text{ nm}$  und  $N = 14$ . Dazu war es allerdings notwendig, das Molekulargewicht aus einer Extrapolation der Streukurven auf den Streuwinkel Null zu erhalten. Durch die Feinstruktur der Streufunktion ist eine derartige Extrapolation — sowohl in der Guinier-Auftragung als noch stärker in der Reziprokauf-

tragung (*Zimm*) — sehr unsicher. Die Welligkeit des Streukurvenverlaufs wurde dabei nicht ausgewertet. Als qualitative Erklärungsmöglichkeit wurde eine Krümmungspersistenz (nach *Kirste*) diskutiert. Es könnte sich aber auch um die Folge einer Fernordnung in der Lösung oder um die *MIE*- oder *Rayleigh-Gans*-Streuung des Gesamtteilchens handeln. Auf Grund des Superpositionsprinzips ist es durchaus möglich, daß der Streukurvenverlauf von der Überknäuelstruktur der Teilchen festgelegt wird, der sich die *Rayleigh-Gans*-Streuung des Gesamtteilchens als Feinstruktur überlagert. Beide Phänomene können natürlich auch nebeneinander von verschiedenen Teilchensorten in der Lösung hervorgerufen werden. In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, durch Kombination aller zur Verfügung stehenden Indizien diesbezüglich Klarheit zu gewinnen.

## 2. Zur Interpretation der Streufunktion als Folge einer Lösungsfernordnung

Läßt man DNA-Lösungen längere Zeit ruhen, tritt die nicht monotone Komponente in der Streufunktion immer deutlicher hervor und wird schließlich zum dominierenden Faktor. Dieser Vorgang ist in Abb. 4 und 5 zu erkennen. Die scharf hervortretenden Maxima legen die Vermutung nahe, daß es sich bei dem Strukturierungsvorgang um die Ausbildung einer Fernordnung in Form einer smektischen oder nematischen Phase handeln könnte.

Auch die Möglichkeit einer Interpretation der Streuinterferenzen als intrapartikuläre Effekte wurde von uns diskutiert<sup>14</sup>. Dabei ergaben sich allerdings eine Reihe von Widersprüchen. Wie gezeigt wurde, können die Teilchen nicht, wie es im Falle einer flüssig-kristallinen Anordnung am wahrscheinlichsten wäre, parallel und äquidistant gepackt sein. Um die Meßdaten mit dem diskutierten Modell in Einklang zu bringen, muß man annehmen, daß die Doppelhelixstränge zu Bündeln gepackt sind, daß also in der Lösung Multimerisationsprozesse stattfinden. Die Multimerenteilchen müßten auf Grund ihrer großen Abmessungen selbst eine nicht monotone Partikelstreuefunktion hervorrufen, die allerdings von der interpartikulären Streuung überdeckt werden könnte. Ein weiteres Argument gegen das flüssig-kristalline Modell liefert die Beobachtung, daß sich die Lage der Interferenzextremwerte nicht genau durch das *Braggsche* Gesetz beschreiben läßt. Nach *Hosemann*<sup>15</sup> müßte man auch in einem flüssigen Kristall eine sehr viel geringere Gitterenergie und damit eine viel größere Schwankungsbreite erwarten, als mit der beobachteten Schärfe der Interferenzen zu vereinbaren ist.

Nach alldem muß geschlossen werden, daß man den Interpretationsversuch als Lösungsordnung als widerlegt betrachten kann.

### 3. Zur Interpretation der Streufunktion als Folge großvolumiger Multimerisate

Als dritte Interpretationsmöglichkeit der nicht monotonen Streufunktion bei *DNA*-Lösungen muß noch das Vorhandensein von gegen die Wellenlänge großen Multimerisatteilchen erwogen werden. Auch für diesen Fall muß man einige einschränkende Bedingungen beachten: Die in Frage stehenden Teilchen müssen groß, einheitlich und, wenn man sie mit Hilfe einer einfachen Theorie auswerten will, kugelig und homogen sein. Mit Ausnahme der ersten werden diese Bedingungen nur unvollständig erfüllt sein.

Was den Einfluß der Polydispersität betrifft, wurde gezeigt, daß sich die Unterschiedlichkeit der nebeneinander vorkommenden Unimeren- und Multimerenphasen kaum auf die Auswertbarkeit der Streuextremwerte auswirkt. Die Multimerenfraktion muß allerdings in sich eine relativ enge Größenverteilungsfunktion aufweisen, weil sonst die Welligkeit der Funktion geglättet wird.

Die Multimeren brauchen nicht kugelig zu sein, um eine nicht monotone Streufunktion zu liefern. Voraussetzung ist nur, daß ihre Querdimensionen genauso wie die Längendimension gegenüber der Lichtwellenlänge ins Gewicht fallen. Kennt man aber den Gestalttyp nicht, ist eine Auswertung sehr schwierig. Wir werteten daher die Feinstruktur unter Zugrundelegung der *Rayleigh-Gans*-Streufunktion für Kugelstrahler aus und erhielten damit die Dimensionen von Kugeln, die den realen Teilchen streuungsäquivalent sind.

#### Größe der Multimerisatteilchen

Unter Zugrundelegung der Hypothese, daß die Streukurvenform durch das Vorhandensein großvolumiger Multimerisatteilchen bestimmt wird, wurde versucht, die Kurvenextremwerte nach der *Rayleigh-Gans*-Theorie auszuwerten. Es fand sich, daß die abgeleitete Beziehung für die relative Lage der Extremwerte [Gleichung (4)] im Rahmen der zu erwartenden Fehlergrenze jeweils sehr gut anwendbar war. Dagegen gehorchte die Extremwertlage nie der *Braggschen* Beziehung.

Abb. 6 zeigt an einigen willkürlich ausgewählten Beispielen die Abhängigkeit der Extremwertlage von deren Ordnungszahl  $N$ . Man sieht, daß Gl. (4) relativ gut erfüllt ist. Dies spricht dafür, daß das *Rayleigh-Gans*-Modell auf *DNA*-Multimerisate anwendbar ist.

In Tab. 1 wird eine Übersicht über die für die an verschiedenen *DNA*-Proben bestimmten *Rayleigh-Gans*-Äquivalentdurchmesser angegeben. Die Werte sind auf  $c = 0$  extrapoliert. Es wurde jeweils der sich nach längerer Alterung einstellende Assoziationszustand zu-

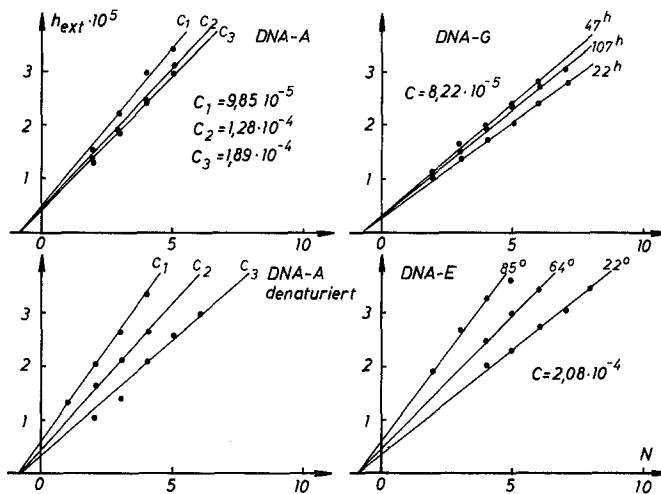


Abb. 6. Lage der Streukurvenextremwerte  $h_{\text{ext}}$  aufgetragen gegen ihre Ordnungszahl  $N$  für verschiedene Lösungen

Tabelle 1. Nach der Rayleigh-Gans-Theorie errechnete Äquivalentdimensionen der Multimerenteilchen für die untersuchten DNA-Lösungen

DNA	Art	Lösungsmittel	$D_{R.G.}$ (nm)	$S_{R.G.}$ (nm)
A	L. Sp. <sup>a</sup>	Phosphatpuffer	655	254
A	L. Sp.	NaOH + NaCl, pH = 12	561	211
B	L. Sp.	Phosphatpuffer	900	348
C	K. Th. <sup>b</sup>	Phosphatpuffer	714	277
D	K. Th.	Phosphatpuffer	720	279
E	K. Th.	Phosphatpuffer	450	174
F	K. Th.	0,01 N-NaCl	640	248
G	K. Th.	0,01 N-NaCl	730	283

<sup>a</sup> L. Sp.: aus Lachssperma.

<sup>b</sup> K. Th.: aus Kalbsthymus.

grunde gelegt. Die nach der für isotrope Kugeln gültigen Beziehung  $20 S^2 = 3 D^2$  errechneten äquivalenten Streumassenradien  $S_{R.G.}$  wurden ebenfalls angegeben.

Die niedrigen Werte bei der in Lösung gelagerten Probe **DNA-E** sind irreführend. Bei dieser Probe hatte sich während der Lagerung eine erhebliche Menge großvolumiger Gelpartikel gebildet, die allerdings bei der anschließenden Entstaubungfiltration entfernt wurden.

## Art der Multimerisate

Über die Frage, ob es sich bei den übermolekularen Teilchen um Aggregate oder Assoziate handelt, kann die Konzentrationsabhängigkeit der Streueigenschaften Auskunft geben. Leider ist es beim Auftreten einer nicht monotonen Streufunktion nicht leicht möglich, aus der Absolutstreuintensität auf ein scheinbares Molekulargewicht im Sinne von *Elias*<sup>16</sup> zu schließen, weil eine einwandfreie Extrapolation auf  $\Theta = 0$  in diesem Fall voraussetzt, daß man bis zu sehr kleinen

Tabelle 2. Konzentrationsabhängigkeit der Dimensionen der *DNA*-Multimeren (Rayleigh-Gans-Auswertung)

<i>DNA</i>	Konzentration (g cm <sup>-3</sup> )	$D_z$ (nm)
<b>A</b>	$9,35 \cdot 10^{-4}$	920
	$6,23 \cdot 10^{-4}$	650
	$3,87 \cdot 10^{-4}$	$\approx 650$
<b>B</b>	$4,93 \cdot 10^{-4}$	880
	$3,05 \cdot 10^{-4}$	890
	$1,41 \cdot 10^{-4}$	900
<b>E 1</b>	$1,89 \cdot 10^{-4}$	505
	$1,275 \cdot 10^{-4}$	500
	$9,58 \cdot 10^{-5}$	455
<b>F</b>	$3,12 \cdot 10^{-4}$	570
	$1,586 \cdot 10^{-4}$	620
<b>G</b>	$8,22 \cdot 10^{-5}$	765
	$5,22 \cdot 10^{-5}$	710
	$2,61 \cdot 10^{-5}$	730

Streuwinkel messen kann, um noch den *Guinier*-Bereich zu erfassen (*Sadron*<sup>17</sup> und *Zimm* et al.<sup>18</sup> haben wiederholt darauf hingewiesen, daß bei Lösungen hochpolymerer *DNA* nur Kleinwinkellichtstreuungsmessungen brauchbare Molekulargewichtswerte liefern). Die Lage der charakteristischen Punkte auf der Winkelachse ist jedoch, wie die Erfahrungen der Röntgenkleinwinkelstreuungsmethode zeigen, relativ wenig konzentrationsabhängig. D. h. man kann wohl mit einiger Sicherheit die Teilchendimensionen aus einer bei einer endlichen Konzentration bestimmten Streukurve gewinnen, nicht aber die Teilchenmasse.

In Tab. 2 wird für verschiedene *DNA*-Proben die Konzentrationsabhängigkeit der *Rayleigh-Gans*-Kugeldurchmesser der Multimerenkomponente angegeben. Mit Ausnahme der Probe *DNA-A*, bei der in der relativ stark konzentrierter Lösung ( $c \approx 10^{-3}$  g cm<sup>-3</sup>) ein um 50 %

größerer Teilchendurchmesser gefunden wurde als in den verdünnten Lösungen, kann keine signifikante Abhängigkeit der Teilchendimensionen von der Konzentration festgestellt werden.

Daraus ist zu schließen, daß der Multimerisationsgrad im betrachteten Konzentrationsbereich nicht wesentlich von der Konzentration abhängt, daß es sich bei den Multimeren eher um *Aggregate* als um konzentrationsabhängige *Assoziate* handelt.

### Zeitlicher Verlauf der Aggregation

Bei allen untersuchten *DNA*-Lösungen wurde gefunden, daß sich die Streufunktion ändert, wenn man die Lösungen nach der Entstaubung längere Zeit in der Küvette lagert. Abb. 4 und 5 zeigen an Beispielen die Änderung der Form der Streufunktion beim Stehen in der Lösung. Meist wurde erst nach einigen Stunden, mitunter erst nach Tagen, eine sich nicht mehr ändernde Streuung festgestellt. Der nicht monotone Charakter der Streufunktion nahm dabei stetig zu, so daß man das beobachtete Phänomen als Bildung großer Aggregate in der Lösung deuten kann. Weil der Entstaubungsvorgang in unseren Fällen selbst mehrere Stunden in Anspruch nahm, ist auch schon bei den unmittelbar im Anschluß an die Filtration vermessenen Lösungen mit dem Vorhandensein von Aggregaten zu rechnen. So kann erklärt werden, daß wir in keiner Probe eine reine Stäbchenstreufunktion, wie sie für native *DNA* zu erwarten wäre, finden konnten. Dagegen lassen sich manche unmittelbar nach der Entstaubung erhaltenen Streufunktionen als Superknäuelstreufunktion interpretieren (ein deutliches Beispiel ist in Abb. 2 zu sehen).

Die Auswertung der Lage der Streukurvenextremwerte nach der *Rayleigh-Gans*-Theorie zeigte, daß die Dimensionen der Aggregate nach der Filtration erst zunehmen, ein Maximum durchlaufen, um dann einem annähernd konstanten Verlauf zuzustreben. Einige typische Beispiele zeigt Abb. 7 (Probe *DNA-E* und *DNA-G*). Qualitativ war der Verlauf bei allen untersuchten Proben ähnlich, Zeit- und Dimensionsmaßstab hingen jedoch von der Art der Probe, der Konzentration und der Art der Behandlung ab. Kurzzeitiges Schütteln, Rühren oder Erwärmen beschleunigte den Vorgang.

Die Gesamtstreuintensität veränderte sich gleichzeitig mit der Ausbildung der Streukurvenstruktur. Dies ist einerseits auf das Steilerwerden der Streufunktion und dem damit verbundenen Intensitätsanstieg im Kurveninnenteil (Lichtstreuungsbereich) während des Multimerisationsvorganges zurückzuführen. Andererseits wurde beobachtet, daß sich auch das Brechungssinkrement während der Lagerung der Lösung in der Refraktionsküvette stark ändert. Abb. 8

zeigt die zeitliche Veränderung des Brechungsinkrements bei der Probe *DNA-G* ( $c = 8,22 \cdot 10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$ , Meßtemperatur  $20^\circ\text{C}$ ). Die Probe war nach der Dialysebehandlung genauso einer Entstaubungfiltration unterworfen worden wie die mit der Lichtstreuungsmethode unter-

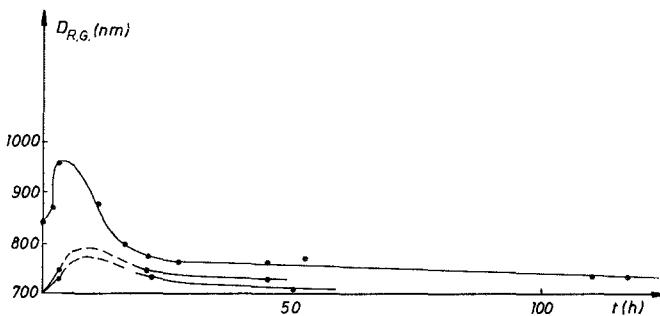


Abb. 7. Veränderung der *Rayleigh-Gans*-äquivalenten Dimension der Aggregate beim Stehen in der Kuvette ( $t$  Standzeit in der Kuvette nach dem Filtrieren)

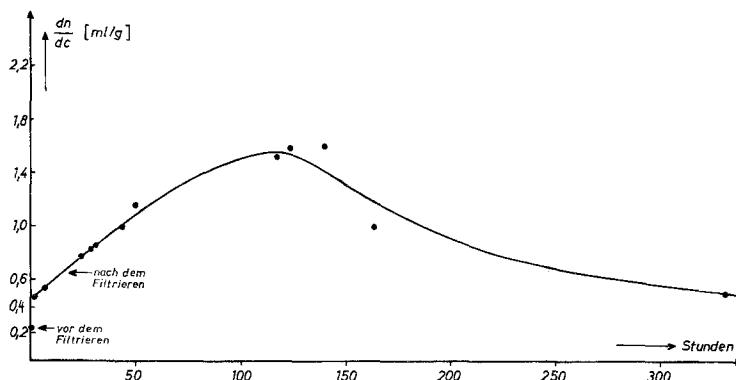


Abb. 8. Zeitliche Änderung des Brechungsinkeinkrements bei Probe *DNA-G* während des Stehens in der Refraktionsküvette ( $c = 8,22 \cdot 10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $\lambda = 546 \text{ nm}$ )

suchten Lösungen. Auch das Brechungsinkrement durchläuft beim Stehen der Lösung ein Maximum. Wegen der Nichtkonstanz des Brechungsinkrements wurde in den Fällen, wo dieser Wert nicht unter mit der Lichtstreuungsmessung identischen Bedingungen ermittelt werden konnte, auf eine Auswertung der Absolutstreuintensität verzichtet.

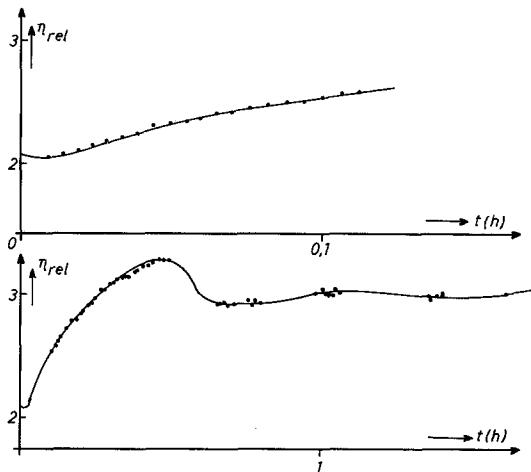


Abb. 9. Zeitabhängigkeit der Viskosität einer Lösung von *DNA-G* in Puffer gemessen im *Zimm-Crothers-Viskosimeter*<sup>19</sup>

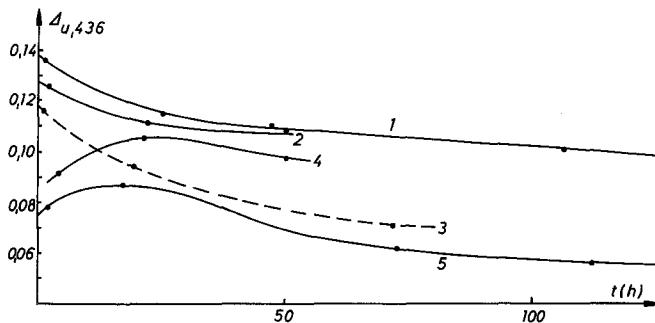


Abb. 10. Änderung des Depolarisationsgrades  $\Delta_{u,436}$  beim Stehen von *DNA*-Lösungen. 1. *DNA G*,  $c = 8,22 \cdot 10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$ ; 2. *DNA G*,  $c = 5,22 \cdot 10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$ ; 3. *DNA G*,  $c = 2,61 \cdot 10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$ ; 4. *DNA F*,  $c = 3,12 \cdot 10^{-4} \text{ g cm}^{-3}$ ; 5. *DNA E*,  $c = 9,58 \cdot 10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$

In diesem Zusammenhang muß auch auf die Änderung zweier anderer Eigenschaften beim Stehen der Lösung hingewiesen werden. In Abb. 9 wird gezeigt, daß sich die Low-Shear-Viskosität sowohl bei sehr langsamem Scheren als auch beim Stehen ändert. Ein Vergleich dieser Messungen der Zeitabhängigkeit mit den statischen, optischen Messungen ist natürlich nur unter großer Vorsicht möglich, es kann jedoch mit Sicherheit qualitativ auf dasselbe zugrunde liegende Phänomene geschlossen werden.

Auch der Depolarisationsgrad ändert sich beim Stehen der Lösungen. Bei längerer Dauer nimmt er immer ab, er kann jedoch auch anfangs etwas zunehmen (Abb. 10). Das Sinken des Depolarisationsgrades weist auf die Ausbildung isotroper Strukturen in der gealterten Lösung hin. Der anfängliche Anstieg wird wahrscheinlich dadurch

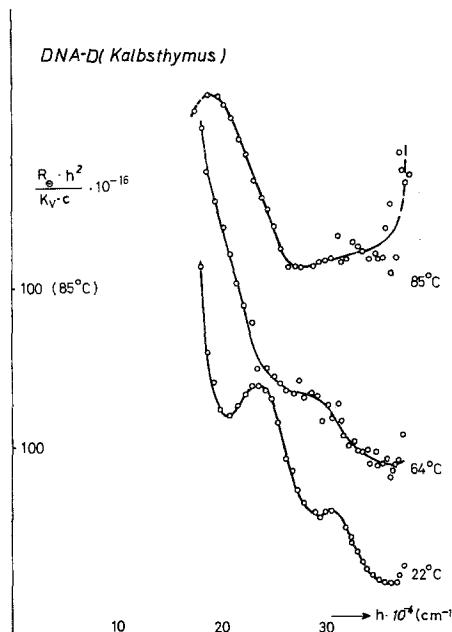


Abb. 11. Änderung der Streufunktion beim Erwärmen ( $DNA\text{-D}$ ,  $c = 2,07 \cdot 10^{-4} \text{ g cm}^{-3}$ )

verursacht, daß die Tertiärstruktur der Unimerenteilchen (Supernäuel mit stäbchenförmigen Doppelhelixsegmenten) durch die Filtration gestört wird, beim Stehen der Lösung aber wieder „ausheilt“. Diese Molekülstreckung verläuft schneller als der parallel dazu einsetzende Aggregationsvorgang.

#### Stabilität der Aggregatteilchen

Über die Stabilität der Multimerisate wurden, abgesehen von den rheologischen Messungen, nur wenige Untersuchungen angestellt. Abb. 11 zeigt die Änderung der Streufunktion nach Erhitzen der Lösung in

der Küvette und messen der Streustrahlung bei erhöhter Temperatur (Probe *DNA-F*,  $c = 2,04 \cdot 10^{-4} \text{ g cm}^{-3}$ ). Bei einer *Rayleigh-Gans*-Auswertung ergibt sich eine klare Abnahme der Äquivalentdimensionen mit der Temperatur.

Eine *Guinier*-Auswertung war nicht möglich, weil mit dem zur

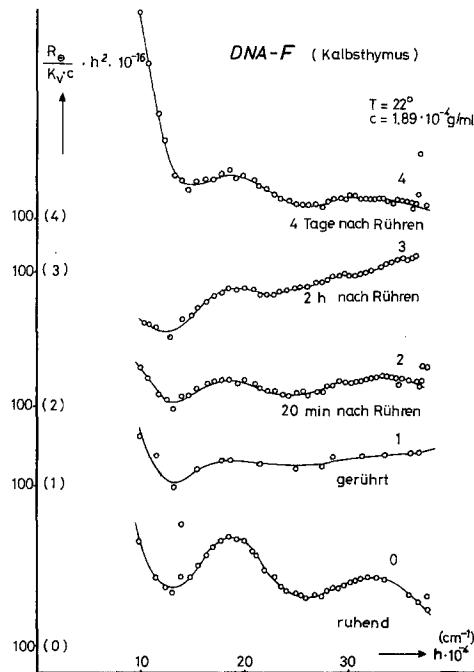


Abb. 12. Einfluß von Rühren auf die Streufunktion (*DNA-F*,  $c = 1,98 \cdot 10^{-4} \text{ g cm}^{-3}$ ,  $T = 22^\circ\text{C}$ ) 4: T Tage, 3: 2 Stunden, 2: 20 Minuten, 1: unmittelbar nach dem Rühren

Verfügung stehenden Gerät keine Kleinwinkelmessungen ausgeführt werden konnten.

Durch mechanisches Rühren der Lösung in der Lichtstreuküvette ließen sich die Multimerisate nicht völlig zerstören. Abb. 12 zeigt den Effekt von einstündigem Rühren mit einem in der Lösung befindlichen Magnetrührkern. Nach dem Rühren zeigte sich ein Zustand, wie er unmittelbar nach dem Filtrieren gemessen wurde. Nach 20 Minuten Standzeit machte sich die Ausbildung der Überstruktur wieder deutlich bemerkbar. Die Streukurve erreichte nach 4 Tagen eine konstante Gestalt.

## II. Das Fließverhalten der Lösungen

Wie aus Abb. 9 hervorgeht, kann sich auch die Viskosität der Lösungen sowohl beim Scheren als auch beim Stehen stark ändern. Dies gilt insbesondere für die bei sehr kleinen Scherraten gemessene Viskosität, aber auch bei stärkerer Scherbeanspruchung wurde immer wieder eine langzeitliche Änderung der Viskosität festgestellt. Durch die scherbedingte Zerstörung der isotropen Multimerisatteilchen und Entstehung gestreckter Bruchstücke (die nicht unbedingt Unimerenteilchen sein müssen) steigt die Viskosität bei anfänglicher Scherung einer schon gealterten Lösung, allerdings in nicht monotoner und schlecht reproduzierbarer Weise, an. Langzeitliche Umordnungsvorgänge können auch wieder ein Absinken zur Folge haben. Es ist somit nur schwer möglich, das rheologische Verhalten gealterter Lösungen durch Kenngrößen zu charakterisieren.

Da die Veränderungen in der Lösung aber langsam verlaufen, so kann man an frisch hergestellten, schnell gefilterten und noch weitgehend multimerisatfreien Lösungen durchaus brauchbare Viskositätsfunktionen erhalten. In dieser Arbeit wurde nur das Viskositätsverhalten der Proben *DNA-A*, **B** und *C* untersucht. Die Proben *DNA-D* bis **G** hatten wir schon in Form von Lösungen erhalten, deren Alterungszustand unbekannt war.

### *Staudinger-Index*

Tab. 3 enthält die *Staudinger-Indices* (bestimmt mit *Zimm-Crothers*-Viskosimeter) und die Werte der konventionellen Grenzviskositätszahlen (bestimmt mit *Ubbelohde*-Viskosimeter) für die frisch gelösten *DNA*-Proben. Man erkennt, daß die nativen Proben eine beträchtliche Strukturviskosität aufweisen, ein Indiz für die große Teilchenanisotropie. Selbst bei den pH-denaturierten Proben (pH = 12,0, eingestellt mit NaOH) findet sich noch deutlich Strukturviskosität.

Tabelle 3. *Staudinger-Indices und konventionelle Grenzviskositätszahlen von frisch gelösten DNA-Proben*

<i>DNA</i>	$[\eta]_0$ (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	$[\eta]_{\text{conv}}$ (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	Lösungsmittel
<b>A</b>	5020	1720	0,05 M-NaCl
<b>B</b>	2040	1405	0,05 M-NaCl
<b>C</b>	6200	2400	0,01 M-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -Puffer
<b>A</b> denat.	820	565	0,1 M-NaOH pH = 12,0
<b>C</b> denat.	1300	790	0,1 M-NaOH pH = 12,0

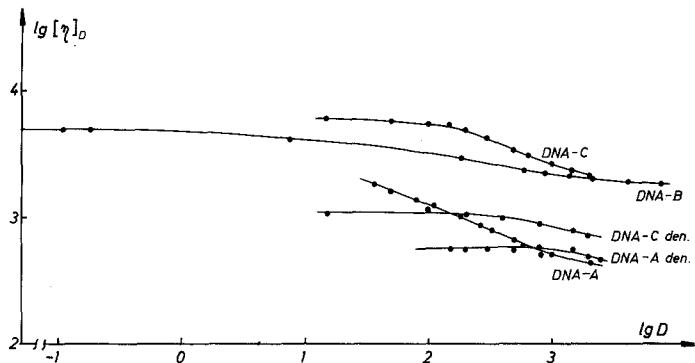


Abb. 13. Doppelt-logarithmische Auftragung der auf verschwindende Konzentration extrapolierten Fließkurven (den. = pH-denaturiert)

Tabelle 4. *Rheologische Kenngrößen der Proben DNA-A, B und C aus den Fließkurven*

	DNA-A nativ	DNA-B gelagert	DNA-C nativ	DNA-A pH-denaturiert	DNA-C pH-denaturiert
$p$	20	3,5	18	$\approx 5$	5
$D_R$ (s <sup>-1</sup> )	36	0,6	43	$\approx 400$	125,9
$ \eta _{\infty,0}$ (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	38,53	4,22	33,11	5,8	5,75
$d_v$ (g cm <sup>-3</sup> )	$7,68 \cdot 10^{-3}$	$2,06 \cdot 10^{-3}$	$5,34 \cdot 10^{-3}$	$7,1 \cdot 10^{-3}$	$4,42 \cdot 10^{-3}$
$a_{SH}$ (nm) <sup>a</sup>	313,6	—	338,8	—	—
$b_{SH}$ (nm)	15,7	—	18,8	—	—
$a_p$ (nm) <sup>b</sup>	170	510	158	62,8	92,4
$b_p$ (nm)	8,5	146	8,8	12,6	18,5

<sup>a</sup>  $a_{SH}$ ,  $b_{SH}$ : aus Superhelixmodell.  
<sup>b</sup>  $a_p$ ,  $b_p$ : aus Fließkurven.

#### Auswertung der Fließkurven

Aus der Form der Scherabhängigkeit der Viskosität kann man auf die Anisotropie und die Rotationsdiffusionskonstante ( $D_R$ ) von rheologisch äquivalenten Rotationsellipsoiden schließen<sup>5</sup>. Dies gibt einen Anhaltspunkt über die hydrodynamisch wirksame Größe der gelösten Teilchen. Abb. 13 zeigt die auf verschwindende Konzentration extrapolierten Fließkurven unserer Proben. Durch einen Fließkurvenvergleich mit den von *Sheraga* theoretisch errechneten Funktionen<sup>20</sup> erhielten wir die in Tab. 4 zusammengestellten rheologischen Kenn-

größen ( $p$ : Achsenverhältnis der rheologisch äquivalenten Rotationsellipsoide,  $D_R$ : Rotationsdiffusionskonstante,  $[\eta]_{\psi,0}$ : auf verschwindende Scherung bezogene Volumen-Grenzviskositätszahl,  $a$ : Polachse,  $b$ : Äquatorachse der Rotationsellipsoide). Die nach dem Superhelixmodell errechneten Werte wurden nach einer früher angegebenen Methode<sup>11</sup> ermittelt.

Man sieht, daß die Proben **DNA-A** und **C** in sehr gestreckter Form vorliegen ( $p = \frac{a}{b} \approx 20$ ). Die gefundenen Rotationsdiffusionskonstanten liegen in derselben Größenordnung wie  $D_R$ -Werte, die für hochmolekulare, native *DNA* mit Hilfe der Strömungsdoppelbrechung ermittelt wurden<sup>21</sup>. Man kann allerdings auch hier nicht annehmen, daß die Moleküle als gestreckte oder nur wenig in Form einer Superhelix gekrümmte Doppelhelixmoleküle vorliegen. Die nach dem Superhelix-Modell aus der rheologischen Dichte errechneten Äquivalentdimensionen liegen etwa doppelt so hoch. Dies läßt darauf schließen, daß die Teilchen flexibler sind als es einer Superhelix entspricht, daß sie also wahrscheinlich in Form einer kurzen Zick-Zack-Kette vorliegen.

Bei **B**, die längere Zeit in trockenem Zustand gelagert worden war, sind offensichtlich auch schon in den frisch bereiteten Lösungen Multimerenteilchen vorhanden, wodurch die durchschnittliche Teilchenanisotropie auf  $p = 3,5$  erniedrigt wurde. Der kleine Wert der Rotationsdiffusionskonstante weist gleichzeitig auf eine viel höhere Teilchenmasse hin.

### Zusammenfassung der Ergebnisse

Aus mehreren früheren Arbeiten (z. B. *Sadron*<sup>18</sup> und *Zimm, Krasna et al.*<sup>18</sup>) geht hervor, daß *DNA*-Moleküle in Lösung Überstrukturen ausbilden, deren Dimensionen und Strukturparameter mit den herkömmlichen Methoden, Lichtstreuung, Ultrasedimentation und Viskosimetrie nur unbefriedigend bestimmbar sind. Dies wird teilweise auf aus der Präparation herstammende, über Polypeptidreste gebundene Aggregate zurückgeführt. Solche Aggregate können durch eine Chymotrypsinbehandlung aufgelöst und beseitigt werden. Andererseits ist auch die Auswertbarkeit aggregatfreier Lösungen dadurch erschwert, daß die *DNA*-Doppelmoleküle sehr groß sind und eine stark elongierte Tertiärstruktur besitzen. In einigen Arbeitskreisen ist es gelungen, das Streuverhalten auf eine gestreckte Stäbchenform zurückzuführen.

Unsere eigenen Untersuchungen ergeben folgendes Bild:

1. *DNA*-Lösungen in Puffer oder Salzlösungen enthalten stets sehr große Aggregatteilchen.

2. Entfernt man diese Teilchen durch Ultrafiltration, werden in der ruhenden, gereinigten Lösung langsam innerhalb einiger Stunden bis zu einigen Tagen neue Multimerisate gebildet.

3. Verdünnt man multimerisathaltige Lösungen, ändern sich weder die Dimensionen noch die relative Konzentration der Multimerisate. Trotzdem kann vermutet werden, daß es sich hierbei nicht um echte Aggregate, sondern um relativ stabile Assoziate handelt. Dies folgt aus der Tendenz zur Nachbildung, der Scherlabilität und der Temperaturempfindlichkeit.

4. Die Assoziatbildung ist ein diffusionskontrollierter Prozeß, der durch kurzzeitiges Erwärmen und durch Rühren gefördert werden kann.

5. Die nicht monotone Feinstruktur aller Streufunktionen ließ sich sehr gut nach der *Rayleigh-Gans*-Theorie nach einem von uns angegebenen Verfahren auswerten. Daraus ist zu schließen, daß die Assoziatteilchen weitgehend isotrop sind, einen vom Lösungsmittel nicht sehr verschiedenen Brechungsindex aufweisen und nicht stark polydispers sind.

6. Eine früher diskutierte Erklärung der Streukurvenfeinstruktur als Folge einer Fernordnung in der Lösung wird nicht mehr für wahrscheinlich gehalten. Die Lage der Streukurven-Nebenextremwerte folgt wohl der *Rayleigh-Gans*-Theorie, nicht aber der *Braggschen* Beziehung. Die Intensität und Schärfe der Nebenmaxima lässt sich in manchen Fällen nicht durch Annahme einer flüssig kristallinen Phase erklären.

7. Bei der Ausbildung der Multimerisate ändert sich auch das Brechungssinkrement. Die Multimerenteilchen zeichnen sich durch eine hohe dielektrische Polarisierbarkeit aus. Dies lässt darauf schließen, daß das von ihnen eingeschlossene Lösungsmittel mit dem Polymeren weitgehend isorefraktiv ist. Das erklärt auch, warum die Teilchen als Ganzes wie *Rayleigh-Gans*-(bzw. *Mie*)Strahler wirken.

8. Auch der Depolarisationsgrad des Streulichts ändert sich im Verlaufe der Alterung der Lösungen. Er nimmt bei längerem Stehen stark ab. Daraus ist ebenfalls auf eine im Verhältnis zu den Unimerteilchen isotrope Struktur der Multimerisate zu schließen.

9. Schwache Scherung der Lösung kann eine langandauernde Veränderung der Viskosität hervorrufen. Ein Ansteigen der Viskosität kann auf deformierende Störung oder eine teilweise Zerstörung der Assoziate zurückgeführt werden.

10. Unmittelbar nach einer Ultrafiltration von Lösungen überwiegen die nicht assoziierten Moleküle. Aus den Streufunktionen und den Fließkurven kann abgeleitet werden, daß ihre Tertiärstruktur am besten durch das Modell eines Superknäuels mit geringer Segmentzahl

angenähert werden kann. Bei Scherung liegt dieser Superknäuel nicht in der statistisch verknäulten, sondern in einer stark gestreckten Form vor. Die Form einer Superhelix erscheint weniger wahrscheinlich.

11. Indizien weisen darauf hin, daß bei ungestörter Lagerung in Lösung sich der Superknäuel durch „Ausheilen“ der gestörten Doppelhelix streckt. Wegen des gleichzeitigen Ablaufens der Assoziation konnte diese Erscheinung nicht direkt untersucht werden.

12. Durch Lagerung der *DNA*-Proben in trockener Form wird die Tendenz zur Gelbildung noch verstärkt.

### Literatur

- <sup>1</sup> *A. Guinier*, Ann. Phys. (Leipzig) **76**, 29 (1925); *A. Guinier* und *G. Fournet*, Small Angle X-Ray Scattering, S. 1—82. New York: Wiley. 1953.
- <sup>2</sup> Lord *Rayleigh*, Proc. Roy. Soc. (London) **A 89**, 25 (1911).
- <sup>3</sup> *R. Gans*, Ann. Physik (Leipzig) **76**, 29 (1925).
- <sup>4</sup> *E. Gruber*, Habilitationsschrift, Darmstadt, 1975.
- <sup>5</sup> *E. Gruber* und *J. Schurz*, Mh. Chem. **105**, 775 (1974).
- <sup>6</sup> *E. Gruber*, *K. Lederer* und *J. Schurz*, Rheometry and Structure-Rheology of Biopolymers, in: Biopolymere und Biomechanik von Bindegewebssystemen (F. Hartmann, Hrsg.), S. 487—504. Berlin-Heidelberg-New York: Springer. 1974.
- <sup>7</sup> *H. Tritthart*, Dissertation, Graz, 1967.
- <sup>8</sup> *E. R. M. Kay*, *N. S. Simons* und *A. L. Dounce*, J. Amer. Chem. Soc. **74**, 1724 (1952).
- <sup>9</sup> *A. I. Krasna*, Biopolymers **9**, 1029 (1970).
- <sup>10</sup> *R. G. Kirste*, Die Struktur wäßriger Nukleinsäurelösungen. Vortrag, Mainz, 1972.
- <sup>11</sup> *J. Schurz*, *H. Uragg*, *M. Belegratis* und *E. Gruber*, Hoppe Seyler Z. physiolog. Chem. **351**, 843 (1970).
- <sup>12</sup> *B. A. Feodorov*, *T. M. Birshtein* und *O. B. Ptitsyn*, Biofizika **8**, 3 (1963).
- <sup>13</sup> *E. Gruber*, Dissertation Graz 1969.
- <sup>14</sup> *E. Gruber*, *R. Gruber* und *J. Schurz*, Makromol. Chem. **158**, 81 (1972).
- <sup>15</sup> *R. Hosemann*, Persönliche Mitteilung.
- <sup>16</sup> *H. G. Elias* und *R. Bareiss*, Chimia **21**, 53 (1967).
- <sup>17</sup> *Ch. Sadron* und *J. Pongyel*, Proc. 4<sup>th</sup> Intern. Congr. Biochem., Vienna 1959, **9**, 52.
- <sup>18</sup> *J. A. Harpst*, *A. I. Krasna* und *B. H. Zimm*, Biopolymers **6**, 585 (1968).  
*J. A. Harpst*, *A. I. Krasna* und *B. H. Zimm*, Biopolymers **6**, 593 (1968).  
*A. I. Krasna*, *J. R. Dawson* und *J. A. Harpst*, Biopolymers **9**, 1077 (1970).
- <sup>19</sup> *B. H. Zimm* und *D. M. Crothers*, Proc. Nat. Acad. Sci. **48**, 905 (1962).
- <sup>20</sup> *M. A. Sheraga*, J. Chem. Phys. **23**, 1526 (1955).
- <sup>21</sup> *R. E. Harrington*, Biopolymers **10**, 337 (1971).