

VRIJE UNIVERSITEIT TE AMSTERDAM

*de relaxatie van dna
in het overgangsgebied tussen
helix- en kluwenconformatie*

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad van Doctor in de Wiskunde en Natuurwetenschappen aan de Vrije Universiteit te Amsterdam, op gezag van de Rector Magnificus Mr. W. F. de Gaay Fortman, Hoogleraar in de Faculteit der Rechtsgeleerdheid, in het openbaar te verdedigen op vrijdag 28 februari 1969 des namiddags om 15.30 uur in het Woestduincentrum, Woestduinstraat 16 te Amsterdam

door

ARNOLD JAN HOFF

geboren te Amsterdam

Promotor : Prof.Dr. Joh. Blok

STELLINGEN

1. Het verdient aanbeveling de theorie over de coöperatieve helix-kluwenovergang in DNA, zoals die is geformuleerd door Lifson en Zimm, uit te breiden door aan de toestand van een basenpaar in een helixgebied een statistisch gewicht toe te kennen, dat afhankelijk is van de grootte van dit gebied.

Lifson, S. en Zimm, B.H. (1963). *Biopolymers* 1, 15

2. De chemische verschuivingen, gevonden voor de waterstofatomen van benzalmalonitril dat is opgelost in benzeen, verschillen van die in een oplossing in chloroform. Weinberger et al. schrijven ten onrechte dit verschil toe aan solvatering van het benzalmalonitril door een benzeenmolekuul op 3,47 Å afstand van het opgeloste molekuul.

Weinberger, M.A., Heggie, R.M. en Holmes, H.L.
(1965). *Can.J.Chem.* 43, 2585

3. Bij de bespreking van de reactiekinetica van de gangbare bereiding van polyethyleenterephthalaat worden door Challa en door Fontana uit metingen van de evenwichtsconstanten ten onrechte conclusies getrokken over de individuele reactieconstanten van de omestering, respectievelijk de polycondensatie.

Challa, G. (1960). *Rec.Trav.Chim. Pays-Bas* 79, 90
Fontana, C.M. (1968). *J.Polymer Sci.* 6, 2343

4. Volgens Fong mag in zijn theorie over de helix-kluwenovergang van DNA de verandering in het traagheidsmoment van een DNA molekuul worden verwaarloosd. Deze bewering is niet juist.

Fong, P. (1964). *Proc.Natl. Acad.Sci., U.S.*, 52, 239

5. De benadering die Crothers toepast bij de behandeling van grote verstoringen van het evenwicht tussen de helix- en de kluwenconformatie van DNA, leidt tot foutieve resultaten.

Crothers, D.M. (1964). *J.Mol. Biol.* 9, 712

6. De veronderstelling van Wetmur en Davidson, dat bij het renatureren van DNA enkele helixwindingen worden gevormd doordat kluwens gedenameerd DNA zich strekken, geeft geen oplossing voor het door hen gestelde probleem.

Wetmur, J.G. en Davidson, N. (1968). J. Mol.Biol. 31,349

7. De suggestie van Aubert, dat de anisotropieconstanten van éénkristallen van nikkel, bepaald met behulp van statische methoden, principieel verschillen van die welke uit ferromagnetische resonantie-experimenten kunnen worden berekend, berust niet op goede gronden.

Aubert, G. (1968). J. Appl. Phys. 39,504

8. Metingen van de electronspinresonantie van DNA dat in droge toestand is bestraald, zouden aan betekenis winnen, indien aan dit DNA een geringe hoeveelheid biologisch actief DNA werd toegevoegd.

9. De conclusie van Niel, dat voor het transport van de grote menhir van Locmariaquer in Bretagne meer dan 3000 man nodig zijn geweest, berust op een onvoldoende begrip van de mechanica.

Niel, F. (1961). Dolmens et Menhirs; Presses
Universitaires de France, p.32

10. Science Fiction literatuur heeft vooral waarde wanneer zij de verhouding mens-machine aan de orde stelt. Het valt echter te betreuren, dat Asimov met het introduceren van de drie wetten der robotica zich tot die gevallen beperkt, waarin de machine volkomen ondergeschikt is aan de mens.

Asimov, I. (1968). I, Robot; Panther Books, London

A.J. Hoff.

*Voor ik verder ga wil ik even vertellen
dat ook mijn manuscripten door mijn
vrouw worden overgeschreven en dat ze de
poëzie in dit verhaal niet begrijpt.*

NESCIO

VOORWOORD

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek kon worden uitgevoerd dankzij de samenwerking tussen de Rijksuniversiteit te Leiden en het Medisch Biologisch Laboratorium RVO-TNO te Rijswijk, die tot stand is gebracht door Prof.Dr. J.A. Cohen, hoogleraar in de fysiologische scheikunde, de toegepaste enzymologie en de radiobiologie en directeur van het Medisch Biologisch Laboratorium.

Mijn erkentelijkheid gaat uit naar allen, die op enigerlei wijze hebben bijgedragen tot het tot stand komen van dit proefschrift.

In het bijzonder ben ik dank verschuldigd

aan Prof.Dr. J.A. Cohen voor zijn kritische belangstelling,

aan mijn promotor Prof.Dr. Joh. Blok, tot voor kort hoofd van de afdeling Stralingsbiofysica van het Medisch Biologisch Laboratorium, voor het richten van mijn aandacht op de relaxatie van DNA en voor zijn stimulerende interesse en waardevolle adviezen,

aan het bestuur van de Rijksverdedigingsorganisatie TNO voor de aan mij als medewerker van het Laboratorium voor Fysiologische Scheikunde geboden gelegenheid dit onderzoek op het Medisch Biologisch Laboratorium te mogen uitvoeren,

aan Ir. J.F. Bleichrodt voor zijn vele suggesties tijdens het onderzoek en voor het kritisch lezen van het manuscript,

aan Drs. G.P. van der Schans, die mij op deskundige wijze heeft ingewijd in de geheimen van de sedimentatie door een sucrosegradiënt,

aan de Heren J.B. Engelen, J.K.W. Schriefer en hun medewerkers voor de vervaardiging van enkele onderdelen van de meetopstelling,

aan de Heren H.E. Groot Bramel, M.J.M. Boermans, J.J. Weber en G.Th.C. Mathlener voor de verzorging van de figuren,

aan Mej. N. Köhler, die het voorbereidende typewerk verzorgde,

aan Mej. D. Christen, die op bekwame wijze het manuscript persklaar maakte,

en aan alle medewerkers van het Medisch Biologisch Laboratorium voor hun hulpvaardigheid en voor de prettige sfeer waarin het onderzoek kon worden uitgevoerd.

INHOUD

Pag.

AFKORTINGEN EN SYMBOLEN

HOOFDSTUK 1. Inleiding	9
1.1. Algemeen	9
1.2. De structuur van DNA	9
1.3. Theorieën over de ontwindings van DNA	11
1.4. Een theorie betreffende de relaxatie van DNA	13
1.5. Enkele experimenten betreffende de relaxatie van DNA	15
1.6. Doel van het onderzoek	17
1.7. Indeling van het proefschrift	17
HOOFDSTUK 2. Methoden	19
2.1. Inleiding	19
2.2. Gebruikte materialen	19
2.3. Het temperatuursprongsysteem	20
2.3.1. De cuvethouder	21
2.3.2. Het verwarmingselement	22
2.3.3. Het thermokoppel	22
2.3.4. De regeling van de temperatuur	22
2.3.5. Ruis	24
2.3.6. "Overshoot"	24
2.4. Spectrofotometrische registratie van de extinctie	25
2.5. Analyse van de experimentele curven	26
2.6. De bepaling van het gemiddelde aantal breuken per DNA molecuul	27
2.7. Het aanbrengen van breuken in DNA	27
2.7.1. Breuk door verwarming	28
2.7.2. Breuk door gammastraling	32
2.7.3. Breuk door hydrodynamische schuifspanningen	33
2.8. Het optreden van breuken in DNA door het verblijf in de verwarmingsapparatuur	33
2.8.1. Breuk door roeren	34
2.8.2. Breuk door het verwarmingselement	34
HOOFDSTUK 3. Relaxatie-experimenten met T4- en T7-DNA	38
3.1. Inleiding	38
3.2. Algemene procedure	38
3.3. Relaxatie van T4-DNA	39

	Pag.
3.3.1. De relaxatietijden τ_1 en τ_2 en de fractie f als functie van D_1	43
3.4. Relaxatie van door schuifspanningen gebroken T4-DNA	44
3.5. Relaxatie van T7-DNA	45
3.6. Renaturering	46
3.7. De invloed van enkelstrengbreuken op de relaxatie van T4-DNA	48
3.8. Samenvatting en discussie	51
HOOFDSTUK 4. Een fenomenologisch model voor de relaxatie van DNA	54
4.1. Inleiding	54
4.2. Het hyperchrome effect	57
4.3. De structuur van gedeeltelijk gedenateerd DNA	58
4.4. Het mechanisme van de relaxatie van de extinctie na een verhoging van de temperatuur	62
4.5. Afleiding van een uitdrukking voor de optische relaxatie van DNA	66
HOOFDSTUK 5. Bespreking van de experimentele resultaten in het kader van het model	71
5.1. τ_1 als functie van D_1	71
5.2. τ_2 als functie van D_1	71
5.3. f als functie van D_1	72
5.4. Renaturering	72
5.5. Enkelstrengbreuken	74
5.6. Gebroken T4-DNA	75
5.7. T7-DNA	76
5.8. Conclusies	77
APPENDIX A. Een mechanisme voor het ontstaan van breuken in DNA door verwarming	78
APPENDIX B. De gemiddelde relaxatietijd van een oplossing van DNA waarin lukraak breuken zijn aangebracht, voor het geval dat τ evenredig is met M^2	80
SUMMARY	83
LITERATUUR	86

AFKORTINGEN EN SYMBOLEN

DNA	desoxyribonucleïnezuur
EDTA	ethyleendiaminetetraacetaat
HMP	4 mM KH_2PO_4 en 6 mM Na_2HPO_4 in water
HMPED	HMP waarin 1 mM EDTA
HMPEP	HMPED waarin 0,5 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ en 0,5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$
M	molekuulgewicht
MD	megadalton
T_b	begintemperatuur van de temperatuursprong
T_e	eindtemperatuur van de temperatuursprong
E	extinctie van een oplossing van DNA
E_n	E van dubbelstrengig DNA bij pH 7 en kamertemperatuur
E_d	E van volledig gedenatureerd DNA
E_1	E bij T_b , vóór de eerste temperatuursprong
E_2	E bij T_e , ná de eerste temperatuursprong
E_3	E bij T_b , na een temperatuursprong $T_b \rightarrow T_e$, gevolgd door afkoeling tot T_b
E_4	E bij T_e na een temperatuursprong $T_b \rightarrow T_e$, een afkoeling $T_e \rightarrow T_b$ en een tweede sprong $T_b \rightarrow T_e$
E_5	E bij T_b , na een sprong $T_b \rightarrow T_e$, een afkoeling $T_e \rightarrow T_b$, een tweede sprong $T_b \rightarrow T_e$ en opnieuw een afkoeling tot T_b
HE	volledig hyperchroom effect, gelijk aan $\frac{E_d - E_n}{E_n}$
D_1	denatureringsindex, gelijk aan $\frac{E_i - E_n}{E_d - E_n}$, waarin $E_i = E_1, E_2$ enz.
R_1	eerste renatureringsindex, gelijk aan $\frac{E_2 - E_3}{E_2 - E_1}$
R_2	tweede renatureringsindex, gelijk aan $\frac{E_4 - E_5}{E_4 - E_3}$
τ_1, τ_2	relaxatietijden
f	de relatieve bijdrage van het relaxatieproces met karakteristieke tijd τ_2 tot de extinctieverhoging na een temperatuursprong

W	het aantal windingen per eenheid van lengte in dubbelstrengig DNA
$W(x,t)$	W ter plaatse x en op tijdstip t na een temperatuursprong
W_h	W van dubbelstrengig DNA bij pH 7 en kamertemperatuur
W_o	W in een helixgedeelte van partieel gedenatureerd DNA bij het begin van de relaxatie
W_1	W in een helixgedeelte van partieel gedenatureerd DNA na volledige relaxatie
W'_o	W in een kluwengedeelte van partieel gedenatureerd DNA bij het begin van de relaxatie

HOOFDSTUK 1

INLEIDING

1.1. Algemeen

Sinds desoxyribonucleïnezuur (DNA) werd geïdentificeerd als het bestanddeel van de cel waarin de erfelijke eigenschappen zijn gecodeerd (1), zijn uitgebreide onderzoeken verricht om fysisch-chemisch te verklaren hoe het DNA zijn biologische functie uitoefent.

Op grond van de röntgenanalyse van kristallijne draden van DNA (2) ontwierpen Watson en Crick (3) een model voor de structuur van DNA, waarmee zij op eenvoudige wijze konden verklaren hoe de genetische eigenschappen worden vastgelegd en aan het nageslacht worden doorgegeven (4). Het is daarom de richtlijn geweest bij de onderzoeken die leidden tot de huidige gedetailleerde kennis omtrent codering, overdracht en vertaling van genetische informatie.

Hoewel het model in dit opzicht uiterst succesvol was, wierp het tevens enige problemen op, die ondanks intensief fysisch-chemisch speurwerk tot dusverre onopgelost zijn gebleven. Dit wordt toegelicht in de volgende paragraaf, nadat eerst het model van Watson en Crick kort is besproken.

1.2. De structuur van DNA

Desoxyribonucleïnezuur bestaat uit een keten van afwisselend een fosfaatgroep en een desoxyribose, die door middel van esterbindingen zijn verbonden. Aan elke desoxyribose is een purine- of een pyrimidinebase gebonden. De structuur van Watson en Crick kan men in gedachten verkrijgen door twee van dergelijke strengen gestrekt naast elkaar te leggen en de zo gevormde band om een denkbeeldige cylinder te winden. Men verkrijgt dan een dubbele schroeflijn. De desoxyribose-ringen staan vrijwel parallel aan de as van de cylinder; de vlakke basen staan loodrecht op de as. Een base van de ene streng ligt steeds met een base van de tegenoverliggende streng in hetzelfde vlak. In het model van Watson en Crick zijn de normaal voorkomende purines adenine (A) en guanine (G) steeds gepaard met de pyrimidines thymine (T) respectievelijk cytosine (C). Hiermede werd een elegante verklaring gevonden voor de waarnemingen van Chargaff en medewer-

kers (5) dat in de door hen onderzochte DNA preparaten steeds de hoeveelheid adenine gelijk was aan de hoeveelheid thymine en de hoeveelheid guanine gelijk aan de hoeveelheid cytosine. Tussen A en T bevinden zich twee en tussen G en C drie waterstofbruggen. Tezamen met de electrostatische wisselwerkingen tussen de basen en de z.g. hydrofobe bindingen zorgen deze ervoor dat de strengen bij elkaar worden gehouden. De afstand langs de as van de cylinder tussen naburige basenparen is 3,4 Å. De DNA schroef heeft een spoed van 34 Å en een diameter van ongeveer 20 Å (6).

Uit het schema van de basenparing volgt direct dat de twee strengen complementair zijn, zodat met de volgorde van de basen in de ene streng de volgorde in de andere streng geheel is bepaald. Watson en Crick veronderstelden nu dat bij de vermenigvuldiging van DNA, waarbij twee identieke dochtermolekullen worden verkregen, de twee strengen van elkaar worden gescheiden en vervolgens elke streng als matrijs dient voor de synthese van de complementaire streng.

Meselson en Stahl (7) toonden aan, dat de dochtermolekullen bestaan uit één streng van het oudermolekuul en één nieuw gesynthetiseerde streng. Dit wees erop, dat de strengen vóór of tijdens de replicatie worden ontwonden. Voor de toentertijd bekende, kleine, DNA molekullen leek dit geen moeilijkheden op te leveren. In de laatste tien jaar werd echter aangetoond, dat er DNA molekullen bestaan met een molekuulgewicht (M) van 100 MD (miljoen daltons) en meer. Uit deze molekullen zouden meer dan 10.000 windingen moeten worden verwijderd in de voor de replicatie beschikbare tijd, die voor virussen met DNA met een molekuulgewicht van 130 MD hoogstens ca. 12 minuten bedraagt (8). De ontwindingssnelheid zou dan buitengewoon groot zijn.

De strengen van het DNA molekuul kunnen ook kunstmatig gescheiden worden door bijv. de temperatuur van de DNA oplossing te verhogen of de oplossing sterk zuur of sterk alkalisch te maken (9): dit proces heet denatureren. Ten gevolge van het denatureren neemt de extinctie bij 260 nm van de DNA oplossing toe; dit wordt het hyperchrome effect genoemd. De toeneming van de extinctie geschiedt over een gering pH of temperatuurgebied. Het denatureringsproces wordt daarom ook wel smelten genoemd en de curve, die in het overgangsgebied het verband weergeeft tussen de extinctie en de pH of de temperatuur, de smeltcurve. Ook bij het smelten kan onder bepaalde omstandigheden de ontwindingssnelheid een zeer hoge waarde bereiken. Voor DNA van de bacterië T4 (M = 130 MD) bijv. is de tijd waarin de strengen kunnen worden gescheiden door verhoging van de pH kleiner dan 1 minuut (10).

Verschillende auteurs hebben getracht een fysisch model te ontwerpen dat het optreden van hoge ontwindingssnelheden bij de replicatie in vivo verklaart. Hierbij werd aangenomen dat bij de replicatie het gehele molekuul dient te ontwinden. Recente onderzoeken wijzen erop, dat voor lange molekullen dit niet het geval behoeft te zijn (121). Voor het denatureringsproces in vitro blijven de ontwindingstheorieën van

belang. Zij zullen daarom in het volgende kort worden besproken.

1.3. Theorieën over de ontwindings van DNA

Kuhn (11) veronderstelt, dat het ontwindingsproces aanvankelijk zo verloopt, dat de diameter van de door één der strengen gevormde schroeflijn groter wordt. Onder invloed van de Brownse beweging zou de andere streng zich vervolgens in de lengterichting door de streng met vergrote diameter kunnen bewegen. De tijd nodig om de strengen op deze manier volledig te scheiden, blijkt evenredig te zijn met M^3 . Voor kleine molekulen geeft deze theorie een aanvaardbare ontwindings tijd. Voor DNA molekulen waarvan M groter is dan 100 MD, wordt deze tijd echter veel te lang in vergelijking met de replicatietijd.

Levinthal en Crane (12) tonen aan dat de ontwindings der strengen door rotatie die door translatie in snelheid overtreft. Zij nemen aan dat bij denaturering aan één uiteinde van de dubbele schroeflijn (voortaan kortweg helix genoemd) de strengen loskomen en in een kluwenachtige structuur overgaan. Het DNA molekuul wordt ontwonden, doordat de helix om zijn as roteert, waarbij het gedenateerde uiteinde niet meedraait ten gevolge van de viskeuze wrijving tussen de kluwens en het oplosmiddel. De vrije energie die beschikbaar komt bij het uit elkaar gaan der strengen, zou worden gebruikt als arbeid om het koppel van de viskeuze wrijving tussen helix en oplosmiddel te overwinnen. De ontwindings tijd blijkt dan evenredig te zijn met M^2 . Dit is niet verwonderlijk, daar de viskeuze wrijving en het aantal windingen evenredig met M toenemen.

Longuet-Higgins en Zimm (13) benaderen het probleem op een iets andere wijze door aan te nemen, dat aan beide uiteinden van het molekuul kluwens van losse strengen ontstaan. Zij veronderstellen dat deze kluwens in tegengestelde richting draaien, terwijl de tussenliggende helix niet roteert. Rekening houdende met de intrinsieke viscositeit van de kluwens, die evenredig is met de wortel uit de lengte van de streng die de kluwen vormt, vinden zij dat de viskeuze weerstand van de draaiende kluwens evenredig is met $M^{3/2}$. De ontwindings tijd blijkt evenredig te zijn met $M^{5/2}$.

Fixman (14) heeft een model ontworpen waarvan de modellen van Levinthal en Crane en van Longuet-Higgins en Zimm grensgevallen zijn. Hij beschouwt een DNA molekuul waarin rotatie mogelijk is van zowel de helix als van de kluwenachtige uiteinden. In tegenstelling tot de voorgaande theorieën wordt niet a priori aangenomen, dat de vrijkomende energie bij de ontwindings van een basenpaar veel groter is dan de gemiddelde energie kT . Dit betekent dat de helix zich zowel kan opwinden als ontwinden. Het grensvlak tussen helix en kluwen kan zich heen en weer bewegen, waarbij over langere tijd gezien het molekuul ontwonden wordt. De snelheid waarmee dit gebeurt, is groter naarmate het energieverval tussen de helix- en de kluwen-

toestand groter is. Fixman toont aan dat, als dit energieverval groot is, het model van Levinthal de voorkeur verdient boven dat van Longuet-Higgins en Zimm.

De besproken theorieën geven geen verklaring voor de wijze waarop de energie die vrijkomt bij het uit elkaar gaan der strengen, wordt omgezet in arbeid om de wrijving bij de rotatie te overwinnen. Fong (15) heeft getracht dit manco te ondervangen door aan te nemen, dat de draaiing het gevolg is van botsingen van watermolekulen met het DNA molekuul. Na verloop van tijd resulteren deze botsingen in een ontwinding van het molekuul. Voor grotere molekulen vindt Fong een ontwindingstijd die evenredig is met M^3 . Zijn berekeningen zijn echter nogal schematisch en het is daarom twijfelachtig of een meer gedetailleerde beschouwing hetzelfde resultaat zal geven.

Bij alle voorgaande modellen wordt aangenomen, dat de ontwinding begint aan de uiteinden van het molekuul, omdat daar de stabiliserende invloed van de wisselwerkingen tussen de basenparen het kleinst is. Voor lange molekulen is het echter waarschijnlijk dat er ook op andere plaatsen in het molekuul gebieden kunnen ontstaan met een kluwenachtige structuur, doordat bindingen tussen de basenparen worden verbroken. Deze zienswijze is de basis van het model van Crothers (16). Er bevinden zich nu meer dan twee grensvlakken tussen helix- en kluwengebieden in het molekuul. Verandering van het totale aantal windingen in het DNA molekuul kan plaatsvinden doordat de uiteinden van het molekuul in tegenovergestelde richting draaien, doordat helixgebieden zich van het inwendige van het molekuul naar de uiteinden bewegen, of doordat kluwengebieden naar de uiteinden migreren. Ook de beweging van de helix- en kluwengebieden gaat gepaard met lokale draaiing van het molekuul. Crothers neemt aan dat de helix- en kluwengebieden heen en weer kunnen bewegen, waarbij er na een kleine verandering van een uitwendige parameter een geringe voorkeur bestaat voor het bewegen van de helixgebieden naar de uiteinden van het molekuul. De ontwinding heeft dus het karakter van een diffusieproces.

Crothers geeft een berekening voor de tijdsafhankelijkheid van het diffusieproces na een kleine verandering in een uitwendige parameter (bijv. pH of temperatuur) ten gevolge waarvan het molekuul overgaat van de ene evenwichtstoestand in het smeltgebied naar de andere. De aanpassing aan de nieuwe evenwichtstoestand wordt relaxatie genoemd. Tijdens de relaxatie verandert de configuratie van het molekuul. Deze verandering kan gemeten worden door bijv. de verandering van de extinctie van een DNA oplossing te volgen.

Het belang van de theorie van Crothers ligt vooral in het feit, dat er een verband wordt gelegd tussen de wijze waarop de ontwinding plaatsvindt en de verandering van een experimenteel meetbare grootte. Er zijn echter enkele bedenkingen aan te voeren tegen de wiskundige uitwerking van de overigens plausibele uitgangspunten. In de volgende paragraaf zullen deze bezwaren worden toegelicht, nadat eerst de theorie kort is besproken.

1.4. Een theorie betreffende de relaxatie van DNA

Crothers beschouwt van een DNA molecuul een segment ter lengte dx , waarbij x wordt gemeten langs de as van het molecuul. Het segment bevat afwisselend helix- en kluwengebieden. De laatste worden opgevat als "ringvormige" gebieden van enkelstrengig DNA, waarin in de evenwichtstoestand geen windingen aanwezig zijn. De helix- en kluwengebieden kunnen in het segment heen en weer bewegen. Verondersteld wordt dat de tijd waarin deze beweging geschiedt, zeer veel kleiner is dan die waarin het aantal windingen in het segment ten gevolge van een kleine verandering in een uitwendige parameter van een waarde W_1 naar de nieuwe evenwichtswaarde W_2 relaxeert. Er stelt zich dan voor elke waarde van het aantal windingen W in het segment een quasi-evenwichtstoestand in, waarbij het verschil dA tussen de vrije energie van het segment dx in de toestand W en in de toestand W_2 een functie is van $W - W_2$. Deze functie wordt voorgesteld door een machtreeks, die wordt afgebroken na de kwadratische term. Gebruikmakend van het feit dat voor $W = W_2$ de vrije energie minimaal is, leidt dit tot de relatie $dA = c(W - W_2)^2 dx$. Aangenomen wordt dat de afgeleide van dA naar W het koppel vormt waardoor het molecuul gaat draaien. Deze rotatie wordt tegengewerkt door de viskeuze wrijving tussen het DNA en het oplosmiddel. Enkele wiskundige bewerkingen, waarbij W wordt geacht een continue variabele te zijn, nl. $W = W(x, t)$, resulteren vervolgens in de bekende diffusie-

vergelijking $D \frac{\partial^2 W}{\partial x^2} = \frac{\partial W}{\partial t}$, met $D = 2c/\beta$, waarin β de wrijvings-

coëfficiënt per eenheid van lengte voorstelt. De vergelijking wordt opgelost voor de randvoorwaarden $W = W_1$, $t = 0$ en $W = W_2$ voor $x = 0, L$ en $t > 0$, d.w.z. het DNA molecuul ter lengte L neemt aan de uiteinden direct de waarde W_2 van de eindtoestand aan. Vervolgens wordt het totale aantal windingen in het molecuul op tijdstip t bere-

kend uit $N(t) = \int_0^L W(x, t) dx$. Uiteindelijk blijkt dat $N(t) - N(\infty)$ gelijk

is aan een som van e -machten, waarvan de coëfficiënten de waarde $8\{N(0) - N(\infty)\}/\pi^2(2j + 1)^2$ hebben en de exponenten gelijk zijn aan $-(2j + 1)^2 \pi^2 D t / L^2$; hierin is j de sommeringsvariabele die loopt van 0 tot ∞ . Het relaxatieproces kan dus voorgesteld worden door een som van eerste-orde processen.

De verandering van de vrije energie wordt berekend volgens een procedure uit de statistische mechanica. Het resultaat is dat $dA/dx = f(\theta', \theta_2)$, waarin θ' de van de tijd afhankelijke fractie gebonden basenparen is in de quasi-evenwichtstoestand met W windingen in het segment dx en θ_2 de fractie in de eindtoestand met W_2 windingen in het segment. θ' wordt berekend door de vrije energie te minimaliseren met betrekking tot θ' bij constante W , waarbij wordt verondersteld dat de verandering in de uitwendige parameter klein is. Na substitutie van

de gevonden waarde van θ' in $f(\theta', \theta_2)$ luidt de uitdrukking voor de vrije energie per segment $dA/dx = \text{ankT}(W - W_2)^2 / 2W_h^2$, waarin a omgekeerd evenredig is met de helling van de smeltcurve, n het aantal basenparen per eenheid van lengte in het DNA molecuul, k de constante van Boltzmann, T de absolute temperatuur en W_h het aantal windingen in een uitsluitend uit helixgebieden bestaand segment. De in het voorgaande gedefinieerde diffusiecoëfficiënt $D = 2c/\beta$ wordt dus $D = \text{ankT}/\beta W_h^2$.

De eerste term ($j = 0$) van de som van eerste-orde processen waarin de relaxatie kan worden ontbonden, geeft het proces met de grootste karakteristieke tijd $\tau_0 = L^2 \beta W_h^2 / \pi^2 \text{ankT}$. De bijdrage van deze term tot de relaxatie is ca. 80% van het totaal. De bijdrage van de tweede term ($j = 1$) is 9 maal zo klein, terwijl de relaxatietijd van dit proces 9 maal zo kort is. De bijdrage van de volgende termen is onder de meetomstandigheden reeds te verwaarlozen. De relatieve bijdrage van de termen is onafhankelijk van θ_1 , d.i. de plaats in de smeltcurve waar de relaxatie gemeten wordt. De relaxatietijden zijn evenredig met de helling van de smeltcurve, maar hun verhouding is hier niet van afhankelijk. Daar de helling van de smeltcurve maximaal is bij het smeltpunt T_m , d.i. de temperatuur waarbij 50% van het maximale hyperchrome effect is bereikt, wordt verwacht dat de relaxatietijden het grootst zijn in het midden van het smeltgebied. Verder zijn de relaxatietijden evenredig met het kwadraat van de lengte van het molecuul, d.w.z. met M^2 .

Tegen de theoretische behandeling van het relaxatieproces door Crothers kunnen verscheidene bezwaren worden aangevoerd. Zo bevat het door hem beschouwde segment dx zowel helix- als kluwengebieden en heeft dus eindige afmetingen. Bij de afleiding van de diffusievergelijking leidt dit tot moeilijkheden, omdat dx dan infinitesimaal klein moet zijn en het segment dus niet meer tegelijkertijd helix- en kluwengebieden kan bevatten. Het moet daarom worden betwijfeld of de oplossing van de diffusievergelijking met de realiteit in overeenstemming is. Zo is een merkwaardig gevolg van deze oplossing, dat $W(x, \infty)$ overal in het molecuul de waarde W_2 heeft. Daar ook in de eindtoestand het molecuul wordt verondersteld opgebouwd te zijn uit helix- en kluwenstukken is dit alleen mogelijk indien W_2 een soort gemiddelde waarde vertegenwoordigt. Het toepassen van de diffusievergelijking op een variabele die een gemiddelde waarde voorstelt, is echter niet geoorloofd.

Het is niet waarschijnlijk dat de randvoorwaarde $W = W_2$ voor $x = 0, L$ en $t > 0$ juist is. De grondslag van de theorie is immers, dat in het smeltgebied ook in het midden van het molecuul kluwengebieden kunnen ontstaan. Men mag verwachten dat de uiteinden de minst stabiele gedeelten van het molecuul uitmaken en in het smeltgebied dus zeker de kluwenconfiguratie zullen hebben. De randvoorwaarde zou dan moeten luiden $W = 0$ voor $x = 0, L$ en $t > 0$.

Ook tegen de berekening van de vrije energie van het segment

dx kunnen bezwaren worden aangevoerd. Er wordt namelijk gebruik gemaakt van het model van Zimm (60), dat een wel zeer geïdealiseerd beeld van DNA geeft. Hierin vormen de strengen de stijlen en de basenparen de sporten van een ladder. De sporten zijn gelijk en ondergaan slechts een wisselwerking tussen naast elkaar gelegen burens. Voorts voert Crothers de relatie $W(x, t) = W_h \cdot \theta' + W_c(1 - \theta')$ in, waarin θ' de fractie gebonden basen op tijdstip t voorstelt en W_c het windingsgetal in een kluwengedeelte. W_c wordt verondersteld alleen ongelijk nul te zijn als het molekuul zich nog niet in de evenwichtstoestand bevindt. De relatie geldt natuurlijk alleen maar als θ' de fractie gebonden basenparen in het beschouwde segment is. In tegenstelling hiermee wordt bij de berekening van dA/dx in de quasi-evenwichtstoestand θ' gelijkgesteld aan de fractie gebonden basenparen in het gehele molekuul. Tenslotte wordt aangenomen dat $1 - \theta$, de fractie ongebonden basenparen in het molekuul, evenredig is met het fractionele hyperchrome effect (in 3.2. gedefinieerd als D_1). Zoals in paragraaf 4.2. zal worden besproken, is de gelijkheid $1 - \theta = D_1$ vermoedelijk niet juist.

1.5. Enkele experimenten betreffende de relaxatie van DNA

Crothers trachtte zijn theorie te verifiëren door de relaxatie van de extinctie bij 260 nm te meten van DNA van de bacteriofaag T2. Het DNA was opgelost in een buffer bestaande uit 8 mM fosfaat, 1 mM ethyleendiaminetetraacetaat (EDTA) en 0,18 M NaCl. In zijn experimenten werd de pH van de oplossing verhoogd door een kleine hoeveelheid van een geconcentreerde loogoplossing toe te voegen. De pH waarbij 50% van het totale hyperchrome effect werd bereikt, bedroeg 11,58. Nadat de oplossingen snel waren gemengd, werd de extinctie gevolgd. De toeneming van de extinctie na de pH-sprong was in het begin onregelmatig, vermoedelijk omdat er tijdens het toevoegen van de loogoplossing plaatselijk hoge loogconcentraties optreden en het DNA daar meer denatureert dan overeenkomt met de toestand na volledige menging.

Het verloop van de extinctie kon daardoor pas na enige tijd nauwkeurig worden gemeten. Het laatste deel van de relaxatie bleek volgens een eerste-orde proces te verlopen. De door Crothers opgegeven relaxatietijd τ_0 heeft betrekking op dit proces, dat zou corresponderen met de eerste term in de som van eerste-orde processen. Of het eerste, snelle gedeelte van de relaxatie eveneens een eerste-orde proces was, kon niet worden bepaald, zodat er dus ook geen relaxatietijd voor kon worden opgegeven. In het midden van de smeltcurve, waar de helling vrijwel constant is, bleef de relaxatietijd ook constant, terwijl buiten dit gebied τ_0 kleiner was.

Door Crothers werden eveneens een aantal relaxatiemetingen verricht met T2-DNA, dat gebroken was door de DNA oplossing gedu-

rende lange tijd te roeren. Het gemiddelde molekuulgewicht M van het gebroken materiaal werd bepaald door de viscositeit van de oplossingen te meten en een door Aten (32) vastgestelde relatie tussen de viscositeit en M toe te passen. Over de homogeniteit van dit materiaal wat het molekuulgewicht betreft, is niets bekend. Het bleek dat de relaxatietijd τ_0 voor molekuulgewichten lager dan 20 MD evenredig was met M^2 . Voor $M = 2$ MD bedroeg τ_0 ca. twee sec, voor 20 MD ca. 230 sec. Voor M groter dan 20 MD echter bleef τ_0 vrijwel constant: voor $M = 100$ MD was τ_0 245 sec. Crothers verklaarde dit door aan te nemen dat in DNA van nature op regelmatige afstanden enkelstrengbreuken voorkomen. De gemiddelde weglengte waarover tijdens de relaxatie kluwen- of helixgebieden diffunderen, zou dan gelijk zijn aan de helft van de afstand tussen twee enkelstrengbreuken. De afstand tussen twee breuken zou dus overeenkomen met een molekuulgewicht van 20 MD.

Recente proeven hebben aangetoond, dat het mogelijk is DNA te isoleren uit de T-even fagen met in minder dan 30% van de molekulen één of meer enkelstrengbreuken (17). Van der Schans (18) heeft aangetoond dat minder dan 10% van de T4 fagen (zeer veel op T2 gelijkende fagen) in verse preparaten een DNA molekuul bevat, waarin één of meer enkelstrengbreuken voorkomen. De hypothese dat de DNA molekulen van de faag T4 van nature enige enkelstrengbreuken bevatten, is dus niet juist. Dit betekent dat de relaxatietijd voor molekuulgewichten groter dan 20 MD inderdaad niet meer toeneemt met het molekuulgewicht, of dat er in het materiaal van Crothers een aantal enkelstrengbreuken per molekuul waren geïnduceerd, bijv. door de isoleringsprocedure.

Enkele andere auteurs hebben eveneens experimenten beschreven, waarbij het verloop van de extinctie van een DNA oplossing of van synthetische polynucleotiden werd gemeten, nadat er een plotse linge verandering in een uitwendige parameter was teweeggebracht.

Spatz en Baldwin (19) hebben van het copolymeer van dAT de relaxatie van de extinctie gemeten na een kleine verandering van de temperatuur in het smeltgebied. Zij maakten gebruik van het door Eigen en de Maeyer (20) ontwikkelde temperatuursprongapparaat. Hiermede kon de dAT oplossing in enige microseconden enkele graden worden opgewarmd. Gedurende enkele seconden bleef de oplossing op de eindtemperatuur en koelde daarna langzaam af. Met deze methode kunnen dus alleen de reacties worden gemeten, die binnen enkele seconden zijn verlopen. Het dAT bleek een relaxatie te vertonen die niet geheel exponentieel was. Aanvankelijk nam de extinctie snel toe; daarna verliep de toeneming bij benadering volgens een eerste-orde proces, dat een relaxatietijd had van enkele milliseconden. De auteurs hebben een uitvoerige studie gemaakt van de afhankelijkheid van deze relaxatietijd als functie van de grootte van de temperatuursprong en van de begintemperatuur van de sprong. Zij kwamen tot de conclusie dat in een bepaald temperatuurgebied onder het smeltpunt gedeelten van de enkele strengen op zichzelf terugvouwden, waardoor er vertakte helixstructuren

zouden ontstaan. De snelle relaxatie werd verklaard door aan te nemen, dat de vele korte takken elk onafhankelijk van elkaar de nieuwe conformatie krijgen die behoort bij de eindtemperatuur van de sprong.

Takashima en Arnolds (21) hebben de denaturering van kalfsthy-mus DNA en zalm sperma DNA bestudeerd door de inhoud van een spectrofotometer cuvet snel op 100°C te brengen. Tijdens en na de opwarming werd de extinctie bij 260 nm gemeten. De inhoud van de cuvet werd verwarmd door middel van in de cuvet geplaatste elektroden, die verhit werden in een hoogfrequent elektrisch veld. De opwarm-snelheid bedroeg 4 à 5°C/sec. Het DNA begon te denatureren nadat de temperatuur van de cuvet hoger dan 85° was geworden. Na 5 sec verliep de extinctietoename exponentieel met een relaxatietijd van ca. 30 sec. Dit experiment is moeilijk te interpreteren, daar het DNA zeker niet monodispers was, terwijl het aantal enkelstrengbreuken niet was bepaald. Gezien de opwarmtijden begon het exponentiële proces waarschijnlijk pas bij 100°, d.w.z. ver boven het smeltpunt, waar-door geen sprake meer is van een evenwichtsreactie.

Peacock en Walker (22) brachten kalfsthy-mus DNA op een be-paalde temperatuur in het smeltgebied en namen op gezette tijden monsters. Deze werden snel afgekoeld in een ijsbad, waarna de ex-tinctie bij 259 nm werd gemeten bij kamertemperatuur. De extinctie bleek exponentieel toe te nemen met de verwarmingstijd. Het is niet bekend of mogelijk optredende renaturering tijdens de afkoelingsperiode en daarna, de resultaten heeft beïnvloed.

Freese en Freese (23) hebben nagegaan hoe snel bacterie DNA met een molekulgewicht van 35 MD zijn vermogen tot transformatie verliest, nadat een oplossing van dit DNA op hoge pH is gebracht. Zij veronderstelden dat de inactivering wordt veroorzaakt door ontwin-ding van het DNA, zodat de inactiveringssnelheid evenredig zou moeten zijn met M^{-2} . Aannemende dat DNA van hogere organismen bij repli-catie op dezelfde wijze wordt ontwonden, verkregen zij door extrapola-tie van hun resultaten ontwindungstijden die de replicatietijd vele malen overtroffen. De auteurs concludeerden hieruit, dat dit hoogmoleculaire DNA van nature enkel- of dubbelstrengbreuken moet bevatten.

1.6. Doel van het onderzoek

De door Crothers opgestelde theorie van de relaxatie van DNA is niet geheel bevredigend, terwijl ook de door hem en anderen ver-richte relaxatie-experimenten aan bedenkingen onderhevig zijn. Het in dit proefschrift beschreven onderzoek is opgezet om door middel van verbeterde experimentele methoden het inzicht in de relaxatie van DNA te verdiepen.

1.7. Indeling van het proefschrift

De methode waarmee de relaxatie werd gemeten, wordt in hoofd-

stuk 2 behandeld. Tevens worden daar een aantal proeven vermeld, waarmee werd nagegaan of het DNA tegen de proefomstandigheden bestand was. Hieruit bleek dat er breuken in het DNA werden geïntroduceerd door verwarming. Dit was aanleiding het breken van DNA bij hoge temperaturen nader te onderzoeken. De resultaten worden ook in dit hoofdstuk vermeld.

Hoofdstuk 3 bevat de resultaten van de relaxatiemetingen met ongebroken T4- en T7-DNA. Tevens worden er de proeven besproken die zijn uitgevoerd met T4-DNA, waarin opzettelijk enkelstrengbreuken zijn aangebracht en worden er de experimenten in vermeld die zijn verricht met door hydrodynamische schuifspanningen gebroken T4-DNA.

De huidige theorieën kunnen de experimentele resultaten niet op bevredigende manier verklaren. In hoofdstuk 4 wordt een model van de denaturering van DNA voorgesteld waarmee, zoals in hoofdstuk 5 wordt besproken, de waargenomen verschijnselen kwalitatief kunnen worden verklaard.

HOOFDSTUK 2

METHODEN

2.1. Inleiding

Om de relaxatie van DNA te kunnen meten moet snel en gelijkmatig een verandering in het milieu worden aangebracht. Bij pogingen de pH-sprongtechniek van Crothers te gebruiken, bleek dat het zeer moeilijk was de DNA oplossing snel te mengen met de loogoplossing zonder het DNA te beschadigen. Na deze ervaringen werd besloten de relaxatie van DNA te bestuderen door het verloop van de extinctie te meten na een sprongsgewijze verandering van de temperatuur. De thermische denaturering heeft bovendien het voordeel dat zij in principe thermodynamisch gemakkelijker te beschrijven is dan die ten gevolge van een verhoging van de pH (24, 25), daar de electrostatische wisselwerkingen tussen DNA en oplosmiddel en tussen de delen van het DNA molecuul zelf, op ingewikkelde wijze door de pH worden beïnvloed.

In dit hoofdstuk worden eerst de gebruikte materialen opgesomd. Daarna wordt een korte beschrijving gegeven van de apparatuur die gebruikt is om de temperatuur van een DNA oplossing in een sprong te verhogen. Vervolgens wordt de nauwkeurigheid van de spectrofotometrische registratie van de extinctie aangegeven en wordt de methode om de experimentele curven te analyseren besproken. Hierna wordt behandeld hoe het gemiddelde aantal enkel- of dubbelstrengbreuken per DNA molecuul werd bepaald en worden enkele methoden besproken waarmee opzettelijk breuken in DNA werden geïnduceerd.

Tenslotte worden enige controle-experimenten vermeld, waarin werd nagegaan of er breuken in het DNA ontstaan tijdens de relaxatie-experimenten. Aangevoerd wordt, dat dit aantal onbetekenend klein is, indien media en omstandigheden geschikt worden gekozen.

2.2. Gebruikte materialen

Om relaxatiemetingen te kunnen interpreteren is het noodzakelijk te beschikken over DNA dat monodispers is met betrekking tot het molekulgewicht. DNA's van bacteriëfagen zijn bijzonder geschikt

voor deze metingen, daar zij onbeschadigd in gezuiverde vorm kunnen worden verkregen. Voor de meeste relaxatie-experimenten is DNA van de faag T4B gebruikt. Dit DNA vertoont grote gelijkenis met het DNA van de verwante faag T2, dat door Crothers werd gebruikt. Het heeft een molekulgewicht van ca. 130 MD (37). Het DNA bevat i.p.v. cytosine 5-hydroxymethylcytosine (5-HMC); de verhouding $(A + T) / (G + 5-HMC)$ bedraagt 1,94 (36). De 5-HMC nucleotiden zijn alle geglucosyleerd; aan 70% is een α -glucosylgroep bevestigd en aan 30% een β -glucosylgroep. Hierin verschilt T4-DNA van T2-DNA, waarin aan 70% van de 5-HMC nucleotiden een α -glucosylgroep is gebonden en aan 5% een α -gentiobiosylgroep (38). De volgorde van de basen in T4-DNA is gepermuteerd, d.w.z. men kan de molekulen ontstaan denken uit cirkelvormige molekulen, die ieder op een willekeurige plaats zijn doorgeknipt (39). Enkele experimenten met T2-DNA toonden geen verschil in de relaxatie-eigenschappen van T2- en T4-DNA.

Ook van T7-DNA werd de relaxatie gemeten. Dit DNA heeft een molekulgewicht van 28 MD (18). De $(A + T) / (G + C)$ verhouding is 1,08. Het DNA bevat geen 5-HMC, is niet geglucosyleerd en niet gepermuteerd (36, 39, 40).

De T4B fagen, oorspronkelijk afkomstig uit het laboratorium van Dr. S. Brenner, werden gekweekt en gezuiverd door de heer A.L.M. Roos volgens de methode van Veldhuizen (41). De T7 fagen, afkomstig van het Laboratorium voor Microbiologie van de Rijksuniversiteit te Utrecht, werden gekweekt en gezuiverd door mej. W.S.D. Verhey volgens de procedure van Lunan en Sinsheimer (42).

Het DNA van de T4 en de T7 fagen werd geïsoleerd volgens de methode van Mandell en Hershey (43), in de variant van Aten (32). Het DNA werd na de isolering gedialyseerd tegen een buffer bestaande uit een oplossing van 6 mM Na_2HPO_4 , 4 mM KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 0,5 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ en 0,5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (HMPEP), pH 7,0. In enkele gevallen werd een buffer gebruikt waaraan geen pyrofosfaat was toegevoegd (HMPED). Het EDTA dient om 2-waardige metaalionen te binden die anders mogelijk aanwezige DNasen zouden activeren, het pyrofosfaat om breuk door het verwarmingselement tegen te gaan. Na dialyse werd het DNA verdund tot ca. 40 $\mu\text{g/ml}$.

2.3. Het temperatuursprongsysteem

De extinctie als functie van de temperatuur kan worden gemeten met een opstelling die in principe bestaat uit een spectrofotometer en een apparaat waarmee de cuvetten van de spectrofotometer worden verwarmd. Om de relaxatie te kunnen volgen dient met het apparaat de temperatuur in een sprong te kunnen worden verhoogd, zodanig dat de opwarmtijd klein is t.o.v. de relaxatietijd van DNA en de temperatuur vóór en na de temperatuursprong constant is. Bovendien mag er geen "overshoot" optreden en moet de temperatuur overal in de cuvet gelijk zijn.

De temperatuur is alleen dan overal in de cuvet gelijk, als de verwarming gelijkmatig is en er geen afkoeling aan de wanden van de cuvet optreedt. Het eerste kan worden bereikt met diëlectrische verwarming of met verwarming door directe stroomdoorvoer, maar bij deze methoden is het moeilijk de temperatuur na de sprong constant te houden. Daarom werd een systeem gekozen, waarbij de verwarming wel in de cuvet doch niet gelijkmatig plaatsvindt. Het optreden van een temperatuurgradiënt wordt vermeden door de oplossing te roeren. De "overshoot" wordt geëlimineerd door zó te verwarmen, dat de warmtetoevoer tijdens het opwarmen evenredig is met het verschil tussen de temperatuur van de DNA oplossing en de gewenste eindtemperatuur.

Het verwarmingselement bestaat uit een platina spoeltje dat om een glazen stampertje is gewonden. Door het spoeltje wordt een verwarmingsstroom gevoerd. Het stampertje beweegt op en neer in de cuvet. Het warmteverlies door de wanden van de cuvet wordt beperkt door de temperatuur buiten de cuvet gelijk aan, of dicht onder de temperatuur van de inhoud te houden. Hiertoe is een holle koperen mantel aangebracht die de cuvet vrijwel geheel omsluit. Door deze mantel wordt water uit een thermostaatbad gepompt.

De stroomsterkte in de spoel, die bepaalt hoeveel warmte er per tijdseenheid wordt afgegeven, wordt geregeld door de spanning van een thermokoppel dat in de cuvet is geplaatst. De stroomsterkte neemt af naarmate het verschil tussen de temperatuur van de cuvet en de ingestelde eindtemperatuur kleiner wordt.

2.3.1. De cuvethouder

De cuvet waarin de oplossing wordt verwarmd, is een Zeiss QS 80 cuvet met een lichtweg van 1 cm en een inhoud van 4 ml. De cuvet rust aan de onderkant op de bodem van de koperen mantel en wordt aan de bovenkant in een teflon blok gedrukt. Dit blok, waaraan de mantel is opgehangen, is bevestigd aan een deksel, dat precies past op de cuvettenruimte van een Beckman DK-2A registrerende spectrofotometer. Om de koperen mantel is een laag Tempex aangebracht als warmteisolator. De warmtegeleiding door het teflon is zeer gering. Het licht van de spectrofotometer bereikt en verlaat de cuvet door spleten in het Tempex en in de mantel. Op het deksel bevindt zich een excentriek, aangedreven door een roermotor. Het excentriek drijft de glazen stamper aan, die op en neer beweegt in de te onderzoeken vloeistof. De DNA oplossing komt dus slechts in aanraking met de inerte materialen kwarts, glas en platina. De referentiecuvet, eveneens een Zeiss QS 80, is direct opgehangen aan het teflon blok. Tussen meetcuvet en referentiecuvet bevindt zich een warmteïsolerend pertinax schot, dat de cuvettenruimte van de spectrofotometer in tweeën deelt. Om te voorkomen dat de temperatuur van de spectrofotometer te hoog oploopt, is aan de deksel een koelspiraal bevestigd, die het gedeelte met de meetcuvet koelt.

2.3.2. Het verwarmingselement

De spoel waardoor de verwarmingsstroom wordt gevoerd, bestaat uit 100 cm platinadraad (diameter 0,2 mm, totale weerstand 3,5 ohm), gewonden om de reeds genoemde glazen stamper. Het gedeelte van de stamper dat in de cuvet steekt, bestaat uit vier verticale spijlen, lengte 35 mm, waartussen twee plateaus van 75 x 80 mm zijn aangebracht. De vier spijlen komen bovenaan samen en vormen dan een holle buis, lengte 15 cm. Door deze buis worden het thermokoppel en de aansluitingen voor het verwarmingselement gevoerd. De buis en daarmee de stamper, wordt gecentreerd door een geleidingsgat in het teflon. De wrijvingscoëfficiënt tussen het glas en het teflon is gering.

2.3.3. Het thermokoppel

Het thermokoppel bestaat uit een Cu-constantaan koppel, waarvan de draden een diameter van 0,2 mm hebben. De draden zijn elektrisch geïsoleerd met PVC, de lassen met isolatielak. Een van de lassen bevindt zich in een buisje gevuld met paraffine-olie, dat geplaatst is in een bekglas met nat ijs. Het bekglas bevindt zich, aan alle zijden omgeven door droog ijs, in een met Tempex afgedekt dewarvat. Door deze voorzorgen wordt bereikt dat de temperatuur van deze las gedurende lange tijd (meer dan 24 h) binnen 0,01°C constant blijft. De andere las van het thermokoppel is gestoken in een dunwandig glazen buisje (inwendige diameter 1 mm). Om de warmteoverdracht te verbeteren bevat ook dit buisje paraffine-olie. Het buisje kan door de buis van de glazen stamper in de meetcuvet worden gebracht. De thermospanning van het koppel bedraagt ongeveer 42 $\mu\text{V}/^\circ\text{C}$.

2.3.4. De regeling van de temperatuur

Het blokschema van de temperatuurregeling is weergegeven in fig. 2.1. De spanning van het thermokoppel is evenredig met het temperatuurverschil tussen de koude las in het ijs en de warme las in de meetcuvet. Deze spanning wordt grotendeels gecompenseerd door de spanning van een in stappen regelbare, zeer stabiele spanningsbron, de compensator. Het overblijvende spanningsverschil wordt in een "chopper" gelijkspanningsversterker (Hewlett Packard 435A) versterkt tot een spanning van max. 1 volt. Deze spanning regelt de sterkte van de stroom van een stroombron die uit een aantal emittervolgers bestaat, geschakeld volgens het systeem Darlington (zie de inzet van fig. 2.1). In de collectorleiding van de eindtransistor van de stroombron is de verwarmingsspoel opgenomen. In principe werkt de stroomregelaar als één transistor: de collectorstroom I_c neemt sterk

toe als de basisspanning V_b iets afneemt.

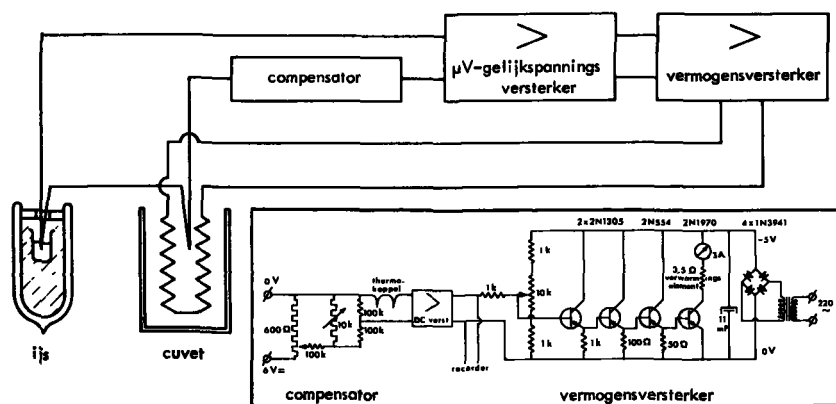


Fig. 2.1 Blokschema van de apparatuur voor de regeling van de temperatuur.
Inzet : Schema van het compensatiecircuit en van de vermogensversterker.

Wordt nu de thermospanning iets ondergecompenseerd door de compensatorspanning enkele microvolts kleiner te maken, dan wordt de regelspanning V_b van de stroombron eveneens kleiner. Het gevolg is dat er een gelijkstroom door het verwarmingselement gaat lopen, waardoor de temperatuur van de inhoud van de cuvet stijgt en de spanning van het thermokoppel toeneemt. V_b wordt groter en de stroomsterkte door de spoel neemt dus af. Er stelt zich een temperatuur in, waarbij zoveel stroom loopt, dat het warmteverlies door de wanden van de cuvet wordt opgevangen. Het geheel werkt dus als een terugkoppelmechanisme. Het warmteverlies door de cuvetwanden wordt zoveel mogelijk beperkt door vrijwel gelijktijdig met het instellen van de compensator de koperen mantel van de cuvet aan te sluiten op een ander thermostaatbad, waarvan de temperatuur ca. $0,1^\circ$ lager is dan de ingestelde eindtemperatuur.

De temperatuur wordt bepaald met de compensator door de thermospanning volledig te compenseren. De compensator werd geijkt door een las in een thermostaatbad te plaatsen, waarvan de temperatuur tot op $0,01^\circ$ gemeten werd met een thermometer, waarbij de gebruikelijke correctie voor de kwikdraad werd toegepast. De temperatuur van het waterbad werd na elke aflezing 2° verhoogd; op die manier werd het gehele traject van 0° tot 100° bestreken. De fout in de absolute temperatuur is kleiner dan $0,1^\circ$, temperatuurverschillen kunnen door lineaire interpolatie tot op $0,01^\circ$ worden bepaald.

Het regelsysteem voor de temperatuur werd ook gebruikt bij het

opnemen van denatureringscurven. Dit had het voordeel, dat de temperatuur van de DNA oplossing nauwkeurig kon worden bepaald en dat de opwarmsnelheid groot was. De smeltcurve kon daardoor worden opgenomen in een tijd, die alleen afhankelijk was van de relaxatie van het DNA na elke temperatuurverandering. Deze tijd was veel korter dan die welke nodig is om smeltcurven op te nemen in een conventionele opstelling.

2.3.5. Ruis

De ruis bestaat uit elektrische storingen, versterkerruis en ruis ten gevolge van temperatuurfluctuaties. De elektrische ruis overheerst bij lage stroomsterkten, d.w.z. bij een klein verschil tussen de temperatuur T_C in de cuvet en de omgevingstemperatuur T_O . Bij hogere stroomsterkten, dus grote $T_C - T_O$, overheerst de ruis ten gevolge van temperatuurfluctuaties. De versterkerruis is te verwaarlozen. De ruis is afhankelijk van de versterkingsfactor van de gelijkspanningsversterker, d.w.z. van de terugkoppelfactor. Hoe groter deze is, des te kleiner zijn de temperatuurfluctuaties. De versterkingsfactor kan echter bij grote $T_C - T_O$ niet onbegrensd worden opgevoerd, daar bij een te grote terugkoppelfactor oscillaties optreden, doordat ten gevolge van de niet-ideale warmte-overdracht overcompensatie optreedt. De ruis is bij een versterkingsfactor van $3,3 \times 10^4$ resp. 10^5 en bij $T_C - T_O$ ca. 3° gelijk aan $0,02^\circ$ resp. $0,01^\circ$.

2.3.6. Overshoot

De toelaatbare grootte van de "overshoot" wordt bepaald door de relaxatietijd van het DNA. Experimenteel blijkt, dat een "overshoot" die kleiner is dan $0,1^\circ$ geen meetbare invloed heeft op de relaxatie van DNA waarvan het molekulgewicht groter is dan 5 miljoen.

De "overshoot" is afhankelijk van de versterkingsfactor en van de grootte van de temperatuursprong. Een sprong van ca. $0,8^\circ$ geeft bij een versterking van $3,3 \times 10^3$ geen "overshoot", maar bij een versterking van 10^4 treedt een "overshoot" van $0,5^\circ$ op. Bij een kleine versterkingsfactor neemt echter de opwarmtijd aanzienlijk toe. Door tijdens de sprong de versterkingsfactor te veranderen kan de opwarmtijd kort worden gehouden en toch "overshoot" worden vermeden.

Doorgaans werd het eerste deel van een sprong uitgevoerd met een versterking van $3,3 \times 10^3$. Als ongeveer 70% resp. 90% van de sprong voltooid was (aangegeven door de meteruitslag van de versterker), werd overgeschakeld op een versterking van 10^4 resp. 10^5 . Het temperatuurverloop tijdens en na een sprong werd vastgelegd door de uitgangsspanning van de versterker te registreren m.b.v. een penschrijver. De opwarmtijd, gedefinieerd als de tijd nodig om 70% van de totale temperatuursprong te bereiken, bedroeg ca. 1,5 sec en was

vrijwel onafhankelijk van de grootte van de sprong. In fig. 2.2 is een registratie weergegeven van de uitgangsspanning van de versterker tijdens en na een temperatuursprong van $0,7^{\circ}$. In de figuur is aangegeven met welke temperatuurverschillen de spanningsverschillen overeenkomen.



Fig. 2.2
Registratie van de gedeeltelijk gecompenseerde, versterkte thermospanning tijdens en na een temperatuursprong van $0,7^{\circ}$, nadat de versterking was omgeschakeld van 10^4 naar 10^5 .

2.4. Spectrofotometrische registratie van de extinctie

Voor de analyse van de relaxatie-experimenten is het essentieel, dat de spectrofotometer lineair is, d.w.z. dat de uitslag over het hele meetgebied evenredig is met de werkelijke extinctie. Dit werd nagegaan m.b.v. thymine-oplossingen van bekende concentratie. De extinctie bij 260 nm van elke oplossing werd gemeten in de Beckman DK-2A spectrofotometer en, ter controle, in een Zeiss PMQ II spectrofotometer. De extincties bepaald met het apparaat van Zeiss bleken binnen de meetnauwkeurigheid evenredig te zijn met de concentratie van de thymine-oplossingen. De Beckman spectrofotometer bleek niet geheel lineair te zijn. Over het extinctiegebied $0,7 - 1,3$ was de afwijking echter kleiner dan 1%. De gebruikte oplossingen van T4-DNA (concentratie $40 \mu\text{g/ml}$) geven voor een temperatuursprong van $0,7^{\circ}$ een extinctieverhoging van maximaal 0,055, zodat de fout ten gevolge van de niet-lineariteit van de spectrofotometer verwaarloosbaar klein is. Extinctieverschillen konden worden gemeten met een nauwkeurigheid van 0,002 extinctie-eenheden. In het gebruikte meetgebied is de Beckman DK-2A stabiel binnen 0,001 eenheid gedurende tenminste 2 uur.

De cuvet met de DNA oplossing is van boven afgesloten door het teflon blok. Door dit blok beweegt zich de glazen stamper. Smeermiddelen konden niet worden toegepast vanwege mogelijke verontreiniging van de DNA oplossing. De afsluiting tussen het blok en de stamper kon daardoor niet dampdicht worden gemaakt. De snelheid waarmee het oplosmiddel verdampt, werd gemeten door een oplossing van thymine in 0,01 M fosfaatbuffer (extinctie bij 260 nm 0,6) langdurig te verwarmen bij 62° onder dezelfde omstandigheden als die bij een relaxatie-experiment. De extinctie van de thymine-oplossing bleek lineair toe te nemen met de tijd. De toeneming van de extinctie kwam overeen met een verdamping van 0,10% per minuut. Uit het gewicht van de cuvet met inhoud vóór en ná de proef werd eveneens een verdamping van 0,10% per minuut berekend.

De relaxatiemetingen dienen voor deze betrekkelijk grote verdamping te worden gecorrigeerd. Daartoe werd de extinctie van de DNA oplossing na de temperatuursprong zó lang gevolgd, dat de toeneming lineair was gedurende tenminste 30 minuten. Voor alle relaxatie-experimenten bleek het voldoende te zijn de extinctie te registreren gedurende ca. 90 minuten na een temperatuursprong. Het lineaire deel van de curve werd naar $t = 0$ geëxtrapoleerd en het verschil tussen deze rechte en de geregistreeerde curve werd verder geanalyseerd.

2.5. Analyse van de experimentele curven

Om de veranderingen van de extinctie zo nauwkeurig mogelijk te kunnen volgen werd in het begin van de relaxatie de maximale papiersnelheid van de penschrijver van de spectrofotometer gebruikt (1 inch/min). Na ongeveer 15 min werd deze snelheid verminderd tot 0,5 inch/min of 0,25 inch/min. Extrapolatie van de uiteindelijke lineaire toeneming was dientengevolge niet mogelijk op de originele grafiek. Bovendien wordt de nauwkeurigheid van de extrapolatie vergroot door de schaal van de extinctie-as te vergroten en die van de tijdas te verkleinen. De extinctieverandering als functie van de tijd werd daarom opgemeten in de originele registratie en opnieuw uitgezet. Na extrapolatie van het lineaire gedeelte tot $t = 0$ werd de waarde van de lineaire extinctietoename afgetrokken van de geregistreeerde extinctie. De zo verkregen gecorrigeerde, constante eindwaarde van de extinctie, $E(\infty)$, werd verminderd met de gecorrigeerde waarde $E(t)$ voor tijdstip t . Vervolgens werd $\log \{E(\infty) - E(t)\}$ uitgezet tegen t .

Wordt aangenomen, dat de relaxatie beschreven kan worden door een som van eerste-orde processen, dan geldt voor het z.g. relaxatiespectrum:

$$E(\infty) - E(t) = \sum_{i=1}^n c_i \exp(-t/\tau_i) \quad (2.1)$$

Hierin is c_i de bijdrage van het i -de proces en τ_i de relaxatietijd van dit proces. Voor grote t wordt de relaxatie beschreven door het proces met de grootste relaxatietijd τ_n ; de grafiek van $\log \{E(\infty) - E(t)\}$ tegen t wordt dan dus een rechte. Uit de helling van deze rechte en uit het snijpunt met de ordinaat kunnen resp. de relaxatietijd τ_n en de bijdrage c_n worden berekend. Door de rechte naar $t = 0$ te extrapoleren en de zo gevonden bijdrage van het n -de proces op elk tijdstip t van de totale extinctieverandering af te trekken, vindt men de verandering t.g.v. de snellere processen. Deze verandering kan opnieuw half-logarithmisch tegen de tijd worden uitgezet en de extrapolatie- en subtractieprocedure kan worden herhaald. Op deze manier kunnen in principe uit de experimentele curve successievelijk alle relaxatietijden en de bijbehorende coëfficiënten c_i worden bepaald.

Uit het oogpunt van de nauwkeurigheid der te verkrijgen resultaten is deze methode in het algemeen alleen gerechtvaardigd als het aantal processen tot enkele is beperkt en de relaxatietijden een orde van grootte verschillen. Voor alle relaxatie-experimenten bleek dit inderdaad het geval te zijn.

2.6. De bepaling van het gemiddelde aantal breuken per DNA molecuul

Bij een aantal experimenten werd T4-DNA gebruikt, waarin opzettelijk enkel- of dubbelstrengbreuken waren aangebracht.

Het gemiddelde aantal enkelstrengbreuken per molecuul (p) werd bepaald met behulp van de sedimentatietechniek van Van der Schans (18). Hierbij wordt het DNA alkalisch gedenateerd (pH 12), daarna geneutraliseerd en op een lineaire sucrosegradiënt (5-23% sucrose in 0,14 M NaCl en 0,02 M Na-citraat (SSC)) gebracht en vervolgens gedurende 2,5 h bij $23,5 \times 10^3$ rpm gecentrifugeerd in een Spinco ultracentrifuge (model L50 of L2). Hierna wordt de centrifugebuis aan de onderkant doorgeprikt en de inhoud met CCl_4 uitgedrukt en door een doorstroomcuvetje geleid. De extinctie bij 260 nm van de inhoud van het cuvetje wordt tijdens het uitdrukken geregistreerd; zo wordt een curve verkregen die de verdeling van het DNA toont zoals die door de sedimentatie in de centrifugebuis is ontstaan. Deze verdeling kan op de door Van der Schans (18) beschreven wijze worden geanalyseerd om p te berekenen. Voor weinig breuken per molecuul bestaat de verdeling uit een piek van ongebroken strengen en een staart, waarin zich de langzamer sedimenterende fragmenten van de gebroken strengen bevinden. Uit de fractie van de totale extinctie in de piek kan p worden berekend door een verdeling volgens Poisson aan te nemen voor de verdeling van de breuken over de molekulen. Voor grotere p neemt de grootte van de piek af en verschijnt er een brede verdeling van de fragmenten. Als wordt aangenomen, dat de plaats van een breuk in een molecuul willekeurig is, kan p worden berekend uit de sedimentatiecoëfficiënt van het maximum van deze verdeling. Een bovengrens voor het gemiddelde aantal dubbelstrengbreuken per molecuul wordt gegeven door $p/2$. Vrijwel altijd was deze bovengrens zo laag, dat hiermee voldoende informatie over het aantal dubbelstrengbreuken werd verkregen. In sommige gevallen werd dit aantal apart bepaald door sedimentatie van dubbelstrengig DNA door een sucrosegradiënt.

2.7. Het aanbrengen van breuken in DNA

Enkelstrengbreuken werden aangebracht volgens twee verschillende methoden. Voor minder dan ca. 15 breuken per molecuul werd het DNA verwarmd bij 60° in HMPEP, d.i. 5° onder het smeltpunt. De uit de literatuur bekende gegevens waren niet toereikend om de

verwarmingsduur te schatten waarbij een bepaald aantal breuken werd aangebracht. Daarom werd voor T4-DNA nauwkeurig het verband bepaald tussen de verwarmingsduur en het aantal geïnduceerde breuken bij een aantal temperaturen rond het smeltpunt. Hierbij bleek de hydrolysesnelheid van de fosfodiesterbinding afhankelijk te zijn van de verwarmingsduur. In paragraaf 2.7.1. wordt hiervoor een verklaring gegeven.

Preparaten met meer dan 15 breuken per molecuul werden verkregen door bestraling van de DNA oplossing in een ^{60}Co gammabron. Dit wordt in paragraaf 2.7.2. toegelicht.

Dubbelstrengbreuken werden aangebracht door een DNA oplossing te onderwerpen aan hydrodynamische schuifspanningen op de in 2.7.3. aangegeven manier.

2.7.1. Breuk door verwarming

Eigner en medewerkers (26, 27, 28) hebben de snelheid bepaald waarmee bij bepaalde temperaturen breuken optreden in gedenatureerd DNA van de bacterie *Escherichia Coli*. Zij bestudeerden de afneming van de sedimentatiecoëfficiënt en van de intrinsieke viscositeit als functie van de tijd. Met behulp van de door Flory en Mandelkern opgestelde relatie werd het gewichtsgemiddelde molekulgewicht (M_w) berekend en hieruit werd de breuksnelheid k verkregen.

Van der Schans heeft gevonden, dat de door Eigner gebruikte constanten in de Flory-Mandelkern vergelijking niet juist zijn (18). Bovendien geldt de door genoemde auteurs gebruikte methode om M_w te bepalen alleen voor paucidispers materiaal. Daar het verder niet zeker was, dat de gevoeligheid voor breuk van gedenatureerd *E. Coli* DNA overeen zou komen met die van dubbelstrengig T4-DNA, werd voor T4-DNA de snelheid gemeten waarmee breuken worden geïnduceerd door verwarming.

Een oplossing van T4-DNA in 0,01 M fosfaatbuffer (pH 7,0) met een concentratie van ca. 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, werd in een thermostaatbad verwarmd. Aan de oplossing was 1 mM ethyleendiaminetetraacetaat (EDTA) toegevoegd, om breukinductie ten gevolge van een eventuele verontreiniging met desoxyribonuclease (DNase) tegen te gaan. Op verschillende tijden werd een monster uit het reactiemengsel genomen om het aantal enkelstrengbreuken te bepalen.

In fig. 2.3 is het gemiddelde aantal geïnduceerde enkelstrengbreuken per molecuul afgezet tegen de tijd (t) bij een temperatuur van 60° , dat is 5° onder het smeltpunt. Alleen voor t kleiner dan ca. 150 min is p evenredig met t . Voor grotere t neemt de helling van de curve sterk toe.

Het is bekend, dat er bij temperaturen van omstreeks 60° en hoger purinebasen van DNA worden afgesplitst (29, 30). Een fosforesterbinding zou gelabiliseerd kunnen worden door depurineren van het naastgelegen nucleoside. Behalve directe hydrolyse van fosforester-

bindingen zou er dan hydrolyse optreden, die een gevolg is van depurineren. In appendix A wordt dit reactieschema uitgewerkt. De experimentele curve van p versus t kan met dit schema inderdaad worden

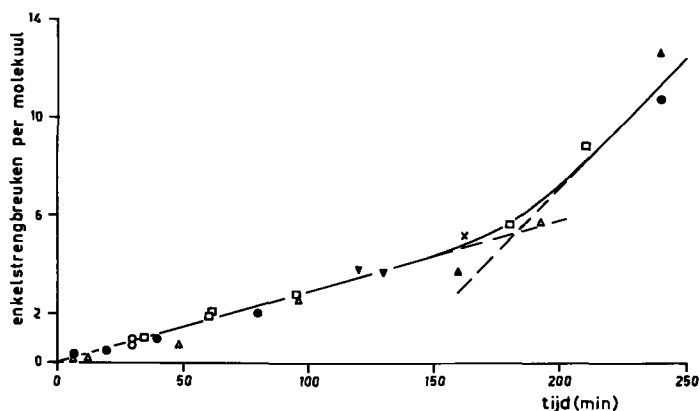


Fig. 2.3 De vorming van enkelstrengbreuken in T4-DNA bij 60°.

Medium : HMPEP

Het gemiddelde aantal enkelstrengbreuken p werd gecorrigeerd voor het aantal breuken in het uitgangsmateriaal.

Verschillende symbolen hebben betrekking op verschillende experimenten.

verklaard. De uit de curve berekende reactieconstanten zijn: depurineren $k_1 \approx 3,2 \times 10^{-9} \text{ sec}^{-1}$, daaropvolgende hydrolyse $k_2 = 9,8 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ en directe hydrolyse $k_3 = 5,9 \times 10^{-10} \text{ sec}^{-1}$. De waarde van k_3 is bij ongeveer 60° op 5% nauwkeurig, bij 75° op ca. 10%. De reactieconstanten k_2 en k_1 zijn nauwkeurig op een factor twee.

Fig. 2.4 geeft een Arrheniusgrafiek voor k_3 rond het smeltpunt. Uit de helling van de curve volgt voor de directe hydrolyse een activeringsenergie van 17,4 kcal/gmol. De waarden van k_1 en k_2 die uit de curven van p vs t worden verkregen, zijn niet nauwkeurig genoeg om een activeringsenergie te berekenen.

De reactieconstanten k_1 en k_3 kunnen worden vergeleken met uit de literatuur bekende waarden. Voor k_3 kan dit niet zonder meer gebeuren, omdat de door Eigner vermelde reactieconstante via een minder nauwkeurige methode uit de waarnemingen is afgeleid. Het is echter mogelijk deze waarnemingen opnieuw te bewerken. Zo geeft Eigner een tabel voor de sedimentatiecoëfficiënt $S_{20,w}$ in SSC van gedenateerd E. Coli DNA, dat thermisch is gedegradéerd in 0,01 M fosfaatbuffer (pH 6,8) bij 84°. Met behulp van de S-M relatie van

Van der Schans voor gedenatureerd DNA in SSC + sucrose ($S_{20,w} = 0,0117 \times M^{0,53}$; de invloed van sucrose op $S_{20,w}$ is te verwaarlozen (31)) werden de bijbehorende gemiddelde molekulgewichten berekend en daaruit de waarden van p . Bij uitzetten van p tegen de tijd werd een soortgelijke curve verkregen als die in fig. 2.3. De corresponderende reactieconstanten waren: $k_1 = 8,1 \times 10^{-8}$, $k_2 = 5,2 \times 10^{-5}$ en $k_3 = 1,8 \times 10^{-8}$.

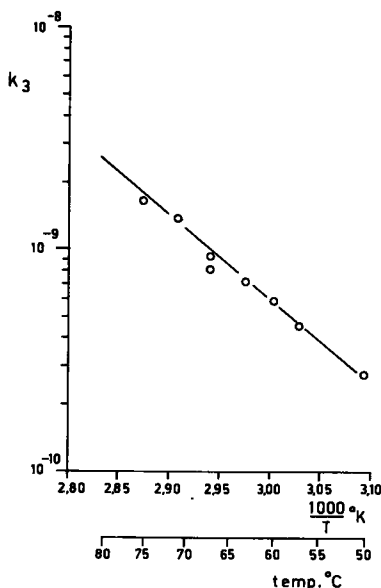


Fig. 2.4 Arrheniuscurve van de reactieconstante k_3 (directe breukinductie).
T4-DNA in HMPEP, $T_m = 67,0^\circ$.

De waarde van k_3 die voor T4-DNA wordt gevonden door extrapolatie van de Arrheniuscurve van fig. 2.4 naar 84° , bedraagt $k_3(84^\circ) = 3,5 \times 10^{-9}$. Deze waarde is een factor 4 kleiner dan bovenvermelde waarde. Dit zou erop kunnen wijzen, dat de hydrolyse in gedenatureerd DNA beduidend sneller verloopt dan in dubbelstrengig DNA, zodat extrapolatie van de Arrheniusgrafiek niet is geoorloofd.

De reactieconstante van de depurinerings is door Greer en Zamenhof (29) onder verschillende omstandigheden bepaald, door de snelheid te meten waarmee adenine en guanine uit kalfsthyms DNA wordt vrijgemaakt. Enkele waarden zijn vermeld in tabel I, tezamen met de waarden van k_1 die werd berekend uit de curve van fig. 2.3.

Tabel I
Reactieconstante voor depurineren van DNA

		60°	65°	81°
0,005 M fosfaat- buffer, pH 6,8 ¹⁾	Adenine	1,0 × 10 ⁻⁸	1,9 × 10 ⁻⁸	2,6 × 10 ⁻⁷
	Guanine		2,0 × 10 ⁻⁸	3,6 × 10 ⁻⁷
SSC, pH 6,8 ¹⁾	Adenine			3,9 × 10 ⁻⁸
	Guanine			4,7 × 10 ⁻⁸
HMPEP, pH 7,0 ¹⁾		3,2 × 10 ⁻⁹		

¹⁾ Greer en Zamenhof (29)

²⁾ k_1 uit fig. 2.3

Fiers en Sinsheimer (46) en Ginoza en medewerkers (30) hebben de snelheid gemeten waarmee biologisch actief, enkelstrengig Φ X174-DNA (zie paragraaf 2.8.2.) wordt geïnactiveerd onder verschillende omstandigheden. De inactivering wordt door de auteurs aan depurineren geweten. Deling van de inactiveringssnelheid door het aantal purines, dat in een Φ X174-DNA molecuul voorkomt (ca. $2,9 \times 10^3$, (102)), geeft dan een getal k_1' dat kan worden vergeleken met k_1 en met de depurineringsnelheid van Greer en Zamenhof. In tabel II zijn enkele waarden van de activeringssnelheid voor verschillende omstandigheden aangegeven, met tussen haakjes de waarde van k_1' .

Tabel II
Inactiveringsconstante van Φ X174-DNA

		60°	80°	84°
Michaelis' buffer ¹⁾	pH 7,5	7,6 × 10 ⁻⁶ (2,6 × 10 ⁻⁹)	1,3 × 10 ⁻⁴ (4,5 × 10 ⁻⁸)	2,5 × 10 ⁻⁴ (8,6 × 10 ⁻⁸)
	pH 6,7	1,0 × 10 ⁻⁵ (3,5 × 10 ⁻⁹)	2,0 × 10 ⁻⁴ (6,9 × 10 ⁻⁸)	3,5 × 10 ⁻⁴ (1,2 × 10 ⁻⁷)
0,1 M fosfaat- buffer ¹⁾	pH 7,1	2,0 × 10 ⁻⁵ (6,9 × 10 ⁻⁹)	1,3 × 10 ⁻⁴ (4,5 × 10 ⁻⁸)	3,2 × 10 ⁻⁴ (1,1 × 10 ⁻⁷)
0,6 × 10 ⁻⁴ tris- buffer + 0,033 M NaCl ²⁾	pH 7,5		1,2 × 10 ⁻³ (4,1 × 10 ⁻⁷)	

¹⁾ Ginoza et al. (30)

²⁾ Fiers en Sinsheimer (46)

De pH en de zoutsterkte van de gebruikte oplossingen blijken de depurineringsreactie enigszins te beïnvloeden. Voor vergelijkbare omstandigheden stemmen de reactieconstanten van tabel I binnen een factor twee overeen met die van tabel II. Uit bovenstaande volgt, dat het niet onredelijk is, het niet-lineair zijn van de curve van fig. 2.3 te wijten aan depurinerings- en daaropvolgende breuk.

2.7.2. Breuk door gammastraling

Preparaten met gemiddeld meer dan 15 breuken per molecuul werden verkregen door een oplossing van DNA in HMPEP te bestralen in een ^{60}Co gammabron. In fig. 2.5a en fig. 2.5b is het verband weergegeven tussen het aantal geïnduceerde enkelstrengbreuken p en de stralingsdosis voor twee verschillende concentraties. Binnen de nauwkeurigheid waarmee p uit het sedimentatiepatroon kan worden bepaald, ca. 5%, blijkt het verband tussen p en de dosis lineair te zijn.

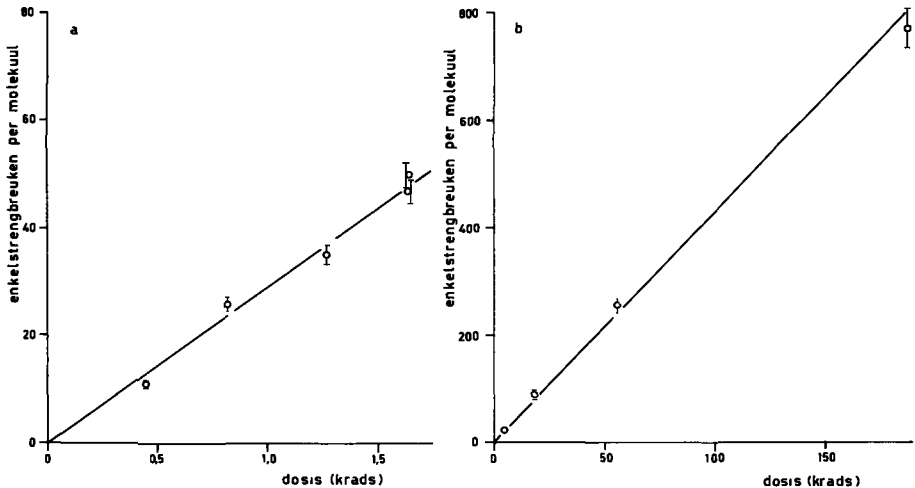


Fig. 2.5 De vorming van enkelstrengbreuken in T4-DNA door ^{60}Co gammastraling.
Medium : HMPEP
(a) 40 $\mu\text{g/ml}$
(b) 400 $\mu\text{g/ml}$

Het aantal dubbelstrengbreuken dat door bestraling wordt geïnduceerd, is onder de gebruikte bestralingscondities 50 tot 100 maal kleiner dan p (31). Door bestraling treden er ook chemische veranderingen in de basen op. Het is onwaarschijnlijk dat voor niet zeer hoge doses deze veranderingen invloed op de relaxatie hebben. Bij enkele proeven met monsters T4-DNA waarin dezelfde waarde van p was verkregen door bestraling of verwarming, werd geen verschil gevonden in de relaxatie-eigenschappen.

2.7.3. Breuk door hydrodynamische schuifspanningen

DNA met een groot molekuulgewicht is zeer gevoelig voor hydrodynamische schuifspanningen die, bijv. door roeren, in de DNA oplossing kunnen ontstaan (45). Indien het DNA molekuul als een starre staaf mag worden beschouwd, breekt het bij voldoende grote schuifspanningen ongeveer in het midden, omdat de op het molekuul werkende krachten daar het grootst zijn. In dat geval is het dus mogelijk, uitgaande van een monodispers preparaat, het molekuulgewicht met een factor 2^n te verkleinen, waarbij n een geheel getal is en bepaald wordt door de maximale snelheidsgradiënt in de oplossing. Het bij een bepaalde snelheidsgradiënt verkregen preparaat zou dan weer monodispers zijn. In de praktijk echter wordt polydispers materiaal verkregen. Het gewichtsgemiddelde molekuulgewicht M_w hiervan neemt continu af naarmate de snelheidsgradiënt toeneemt. Het is gewenst bij relaxatiemetingen DNA te gebruiken, dat zo homogeen mogelijk is wat betreft het molekuulgewicht. De homogeniteit van een DNA monster wordt wel uitgedrukt door de verhouding M_w/M_n , waarbij M_n het aantalgemiddelde molekuulgewicht is. Voor monodispers materiaal geldt $M_w/M_n = 1$, terwijl voor DNA waar lukraak een groot aantal breuken in zijn geïntroduceerd, geldt $M_w/M_n = 2$ (47). M_w en M_n kunnen worden bepaald uit het sedimentatiepatroon dat wordt verkregen door het DNA door een sucrosegradiënt te sedimenteren (18).

Aten heeft een methode beschreven, waarbij het DNA aan een reproduceerbare snelheidsgradiënt wordt onderworpen (32). Het DNA wordt hierbij driemaal door een capillair geperst. Verschillende preparaten van versgeïsoleerd T4-DNA werden met deze methode gebroken. De door sedimentatie bepaalde waarde van M_w/M_n bleek dichter bij 1 te liggen naarmate M_w kleiner was.

2.8. Het optreden van breuken in DNA door het verblijf in de verwarmingsapparatuur

Een van de doelstellingen van het onderzoek was de relaxatie te bestuderen van DNA waarin zo min mogelijk breuken aanwezig waren. Er diende daarom te worden onderzocht of er tijdens de metingen breuken werden geïnduceerd. Het DNA kan worden aangetast door het verblijf bij hoge temperatuur, door de hydrodynamische schuifspanningen die optreden bij het roeren of door agressieve agentia, die zouden kunnen ontstaan door contact van het stroomgeleidende platina spoeltje met de vloeistof. Bij de temperaturen waarbij de relaxatiemetingen werden verricht, worden er gemiddeld ongeveer 1,7 enkelstrengbreuken per molekuul per uur geïnduceerd (paragraaf 2.7.1.). In de volgende paragrafen wordt de invloed van de twee andere mechanismen besproken.

2.8.1. Breuk door roeren

De schuifspanningen die tijdens de beweging van de stamper in de vloeistof ontstaan, zijn gering. De stamper is zó in de cuvet geplaatst, dat de afstand tot de wanden overal groter is dan 1 mm. Hij beweegt over 3 mm op en neer met een frequentie van ca. $1,5 \text{ sec}^{-1}$; de maximale snelheid is 14 mm/sec. De snelheidsgradiënt is dus kleiner dan 14 sec^{-1} . Volgens Aten (32) wordt T4-DNA bij kamertemperatuur pas gebroken bij een snelheidsgradiënt van meer dan 10^4 sec^{-1} . Volgens Freifelder en Davison (33) zou gedenatureerd DNA gevoeliger zijn dan natief DNA. In tegenstelling hiermee wijzen resultaten van Van der Schans (18) erop, dat dit niet het geval is. Nauwkeurige gegevens betreffende de gevoeligheid van DNA voor schuifspanningen als functie van de snelheidsgradiënt zijn echter niet bekend voor hogere temperaturen. Het was dus van belang na te gaan in hoeverre bij hoge temperaturen door het roerapparaat enkel- en dubbelstrengbreuken werden geïnduceerd.

Het bleek, dat er in T4-DNA geen breuken werden geïnduceerd door gedurende 30 min bij kamertemperatuur te roeren. Bij temperaturen waarbij het DNA reeds gedeeltelijk of geheel is gedenatureerd, bleken in 15 min 0,4 enkelstrengbreuken per molecuul te ontstaan. Deze waarde, die gecorrigeerd is voor het aantal breuken ontstaan ten gevolge van de verwarming alleen, was onafhankelijk van de mate waarin het DNA was gedenatureerd en nam niet verder toe bij langer roeren. Mogelijk bevinden zich in de DNA molekulen die voor de experimenten werden gebruikt, bindingen die door de isolatiemethode gelabiliseerd zijn. Uit het bovenstaande blijkt, dat in ieder geval het gemiddelde aantal geïnduceerde dubbelstrengbreuken per molecuul $p/2 = 0,2$ of kleiner is.

2.8.2. Breuk door het verwarmingselement

Uit de specifieke weerstand van 0,01 M fosfaatbuffer bij pH 7 en de geometrie van de verwarmingsspoel kan worden berekend, dat de gemiddelde stroom door de oplossing bij een verwarmingsstroom van 1 ampère ongeveer 2 milliampère bedraagt. Er kan dus electrolyse optreden. Hierbij zouden agressieve producten kunnen worden gevormd, die het DNA aantasten. In deze paragraaf worden een aantal experimenten besproken, waaruit inderdaad blijkt, dat onder bepaalde omstandigheden het DNA wordt aangetast. Het bleek mogelijk de omstandigheden zodanig te wijzigen, dat de schade aan het DNA sterk werd gereduceerd.

Bij de bestudering van de effecten van schuifspanningen en verwarming op DNA was het noodzakelijk T4-DNA te gebruiken, daar voor veel kleinere DNA molekulen de toegebrachte schade niet meer meetbaar is. Bij het onderzoek naar de invloed van agressieve agentia bleek dat de reactiesnelheid groot genoeg was om gebruik te kunnen maken

van het DNA van de bacteriofaag Φ X174. De "replicative form" (RF) van deze faag is een ringvormig, dubbelstrengig DNA molecuul, waarin de dubbele streng nog enige malen om zichzelf gewonden is, zodat een getwijnde structuur wordt gevormd (RF I). Wordt een enkelstrengbreuk aangebracht in een der strengen, dan verandert de conformatie van het molecuul, doordat de getwijnde structuur overgaat in een circulaire configuratie (RF II), waardoor de sedimentatiecoëfficiënt kleiner wordt (34). Wordt een dubbelstrengbreuk aangebracht, dan ontstaat er een lineair molecuul (RF III) met een van RF I en RF II verschillende sedimentatiecoëfficiënt. Door sedimentatie van een mengsel van deze drie vormen kan dus gemakkelijk de fractie molekulen worden bepaald die één, één of meer enkelstrengbreuken of één of meer dubbelstrengbreuken bevatten. Met behulp van RF I kan daardoor op eenvoudige wijze de inductie van breuken worden gemeten.

Een RF preparaat, geïsoleerd door Dr. P.H. Pouwels, werd in een concentratie van 40 $\mu\text{g/ml}$ in 0,01 M fosfaatbuffer gedurende een aantal minuten onder voortdurend roeren verwarmd door stroom te voeren door het platina spoeltje. De stroomsterkte, behorende bij een bepaalde temperatuur, kon worden gevarieerd door de temperatuur van de omhulling van de cuvet te variëren. Vervolgens werd de oplossing gesedimenteerd door een lineaire sucrosegradiënt in SSC. In fig. 2.6 zijn de resultaten weergegeven van drie experimenten bij verschillende

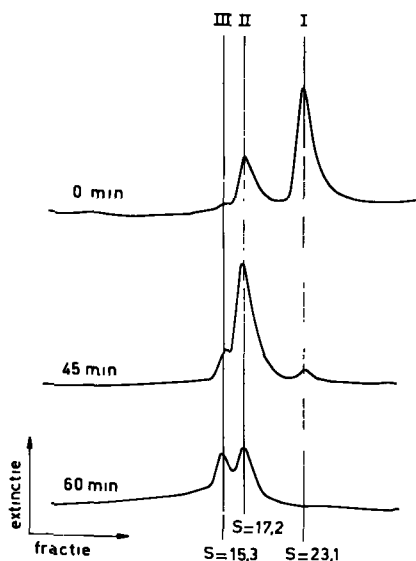


Fig. 2.6

Ontstaan van breuken in dubbelstrengig Φ X174-DNA (RF) bij hoge stroomsterkte: de verdeling van de extinctie na centrifugering in een sucrosegradiënt.

Een oplossing van RF in HMPEP werd in t min van 60° tot 70° opgewarmd bij een gemiddelde stroomsterkte van 0,4 A eh vervolgens snel afgekoeld tot kamertemperatuur. 0,5 ml (40 $\mu\text{g/ml}$) werd op een lineaire sucrosegradiënt (5-23 % in SSC) gebracht en gecentrifugeerd gedurende 16 h bij $23,5 \times 10^3$ rpm.

De sedimentatiecoëfficiënten die met de pieken corresponderen en de waarden van t zijn in de figuur aangegeven.

verblijftijden. De S-waarden van de verschillende componenten van RF zijn in de figuur aangegeven en stemmen overeen met die in de literatuur (34). Het blijkt, dat component RF I wordt omgezet in RF II en

RF III. Een preparaat dat 30 min geroerd werd bij 65° zonder stroomdoorvoer, vertoonde deze omzetting niet. Waarschijnlijk wordt het DNA aangetast door agressieve producten, die bij stroomdoorvoer ontstaan.

Onderzocht werd of de afbraak van het DNA kon worden voorkomen door toevoeging van beschermende stoffen. Dit werd nagegaan met biologisch actief Φ X-DNA, d.w.z. DNA geïsoleerd uit de bacteriofaag Φ X174, dat na penetratie in een bacteriesferoplast in staat is de produktie van nieuwe, complete virusdeeltjes te induceren. Wordt het Φ X-DNA schade toegebracht, bijv. door breuk of chemische verandering van een base, dan verliest het zijn biologische activiteit. De activiteit werd gemeten met sferoplasten van *E. Coli* volgens Guthrie en Sinsheimer (35). Op deze manier wordt geen onderscheid gemaakt tussen breuk en andere biologische schade. Men kan echter volstaan met zeer geringe hoeveelheden DNA vanwege de uitzonderlijke gevoeligheid van deze biologische methode. Dit was van belang, daar de bereiding van voldoende RF materiaal om een aantal potentieel beschermende stoffen te kunnen onderzoeken zeer kostbaar zou zijn.

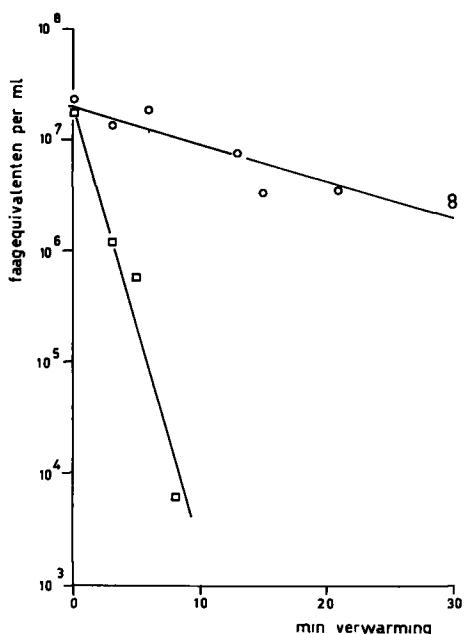


Fig. 2.7

Verlies van de biologische activiteit van Φ X174-DNA ten gevolge van een verblijf in het verwarmingsapparaat bij 70° en 0,85 A.
Medium : HMP
DNA concentratie : 1 μ g/ml
□ - □ - □ geen toevoegingen
○ - ○ - ○ in aanwezigheid van 5 mM natriumpyrofosfaat.

Het bleek, dat pyrofosfaat de gezochte beschermende werking uitoefende. In fig. 2.7 is de inactivering weergegeven van Φ X-DNA als functie van de tijd bij een stroomsterkte van 0,85 A en een temperatuur van 70°. De concentratie van het pyrofosfaat was resp. 0 en 5 mM. De maximale bescherming wordt bereikt bij concentraties van

1-5 mM. Boven 5 mM neemt de beschermende werking geleidelijk af. Om te onderzoeken of de voor enkelstrengig Φ X-DNA gevonden bescherming ook optrad bij dubbelstrengig DNA, werd T4-DNA in 0,01 M fosfaatbuffer met 1 mM EDTA gedurende 15 min blootgesteld aan een stroom van 25 mA bij 65°. Bij deze temperatuur is het DNA voor ca. de helft gedenateerd. Het gemiddelde aantal geïnduceerde breuken, verminderd met het aantal breuken dat door roeren en verwarming alléén was veroorzaakt, bedroeg 3,3 per molekuul. Indien 1 mM pyrofosfaat was toegevoegd aan de oplossing werden bij een stroomsterkte van 75 mA gemiddeld 0,15 breuken per molekuul gevonden. Pyrofosfaat blijkt dus ook T4-DNA goed te beschermen tegen breuk.

Uit het bovenstaande blijkt, dat het van belang is de stroomsterkte zoveel mogelijk te beperken. Dit werd bereikt door na de temperatuursprong een tweede thermostaatbad aan te sluiten op de mantel van de cuvet. Door de temperatuur van dit bad ca. 0,1° onder de eindtemperatuur van de sprong te kiezen, was de stroomsterkte bij temperatuurevenwicht kleiner dan 2 mA. Werd T4-DNA zo gedurende 30 min verwarmd, dan bleken er door de stroomtoevoer geen breuken geïnduceerd te worden, zelfs niet als er geen pyrofosfaat aan de oplossing was toegevoegd. Tijdens de temperatuursprong is gedurende een korte periode (ca. 1 sec) de stroomsterkte ongeveer 1 A. Als voorzorgsmaatregel tegen eventuele breukinductie in deze periode werd toch steeds 1 mM pyrofosfaat aan de oplossing toegevoegd.

HOOFDSTUK 3

RELAXATIE-EXPERIMENTEN MET T4- EN T7-DNA

3.1. Inleiding

In de volgende paragrafen worden de resultaten gegeven van relaxatie-experimenten die werden uitgevoerd met behulp van de in het vorige hoofdstuk beschreven temperatuursprongapparatuur. Om een indruk te krijgen van de invloed van de basensamenstelling van het DNA op de relaxatie werd zowel T4- als T7-DNA onderzocht. T7-DNA bevat 48% G + C, T4-DNA 34%. Hoewel er verschillende soorten DNA van hogere organismen bekend zijn met een groter percentage G + C, werd dit DNA niet gebruikt voor de relaxatie-experimenten, daar dergelijk DNA in tegenstelling tot laag DNA niet monodispers kan worden geïsoleerd.

Het molekulgewicht van T7-DNA is aanzienlijk kleiner dan dat van T4-DNA. Er werden daarom een aantal proeven verricht met door schuifspanningen gebroken T4-DNA om een indruk te krijgen van de invloed van het molekulgewicht op de relaxatie.

3.2. Algemene procedure

In fig. 3.1 zijn schematisch de extinctieveranderingen weergegeven van een DNA oplossing gedurende een relaxatie-experiment.

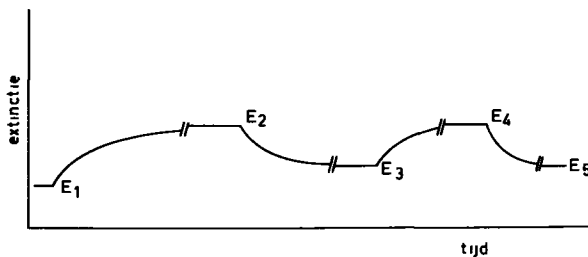


Fig. 3:1 Schematische voorstelling van de verandering van de extinctie bij een relaxatie-experiment.

Versgeïsoleerd T4-DNA (concentratie ca. 40 $\mu\text{g/ml}$ in HMPEP) wordt verwarmd tot een bepaalde temperatuur T_b in het smeltgebied. Noemen we de extinctie bij kamertemperatuur E_n , de extinctie van hetzelfde DNA monster in volledig gedenateerde toestand E_d , dan is $E_d - E_n = HE$ het volledige hyperchrome effect. Zij E_1 de extinctie bij de temperatuur T_b . De denatureringsindex D_1 wordt gedefinieerd als de fractie van het maximale hyperchrome effect die bereikt wordt bij de temperatuur T_b , dus $D_1 = (E_1 - E_n)/HE$. Vervolgens wordt de temperatuur van de DNA oplossing sprongsgewijze verhoogd tot de eindtemperatuur T_e . De extinctie van het DNA relaxeert nu naar de (voor verdamping gecorrigeerde) waarde E_2 , de denatureringsindex is dan $D_2 = (E_2 - E_n)/HE$. In het algemeen wordt onder D_1 verstaan $(E_1 - E_n)/HE$.

Na ca. 1,5 uur, d.w.z. nadat de gecorrigeerde extinctie al geruime tijd constant is bij T_e , wordt de oplossing afgekoeld van T_e naar T_b . De extinctie neemt dan weer af. Dit proces wordt renaturering genoemd. In het algemeen blijkt E_3 , de nieuwe evenwichtswaarde van de extinctie bij T_b , groter te zijn dan E_1 . De renatureringsindex R_1 , d.i. de fractie van de extinctieverhoging die reversibel is bij de afkoeling tot de begintemperatuur T_b , wordt gedefinieerd door $R_1 = (E_2 - E_3)/(E_2 - E_1) = (D_2 - D_3)/(D_2 - D_1)$.

Nadat de extinctie van het DNA de (voor verdamping gecorrigeerde) waarde E_3 bereikt heeft, wordt opnieuw een temperatuursprong ter grootte van $T_e - T_b$ uitgevoerd. De extinctie van het DNA relaxeert dan naar de (gecorrigeerde) waarde E_4 . Vervolgens wordt weer afgekoeld, waardoor de extinctie de waarde E_5 bereikt. De tweede renatureringsindex R_2 , de fractie van de extinctieverhoging ten gevolge van de tweede temperatuursprong die reversibel is, wordt gegeven door $R_2 = (E_4 - E_5)/(E_4 - E_3) = (D_4 - D_5)/(D_4 - D_3)$.

Gelijktijdig met de relaxatiemetingen werd steeds in een monster van het voor de proef gebruikte DNA het gemiddelde aantal enkelstrengbreuken per molecuul bepaald op de in 2.6. beschreven wijze. De door de penschrijver van de spectrofotometer geregistreerde curven van de extinctie tegen de tijd werden volgens de methode van 2.5. geanalyseerd. Voor de extinctieverandering tijdens en na de afkoeling was dit niet mogelijk, daar de afkoeling niet sprongsgewijze kon worden uitgevoerd. Wel kon de tijd worden bepaald waarbinnen het renatureringsproces volledig was beëindigd.

3.3. Relaxatie van T4-DNA

Om nauwkeurig te bepalen bij welke waarde van D_1 de temperatuursprong werd gegeven, was het nodig de smeltcurven van T4- en T7-DNA te bepalen. Deze curven zijn afgebeeld in fig. 3.2 voor DNA in HMPEP. Het smeltpunt (T_m) wordt gedefinieerd als de temperatuur waarbij 50% van het hyperchrome effect is bereikt. In HMPEP is het smeltpunt van T4-DNA $67,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, van T7-DNA $72,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Het verschil in T_m , dat een gevolg is van het verschil in G + C ge-

halte van T4- en T7-DNA, komt overeen met het door Marmur en Doty (44) gegeven verband tussen T_m en het G + C gehalte van DNA opge-

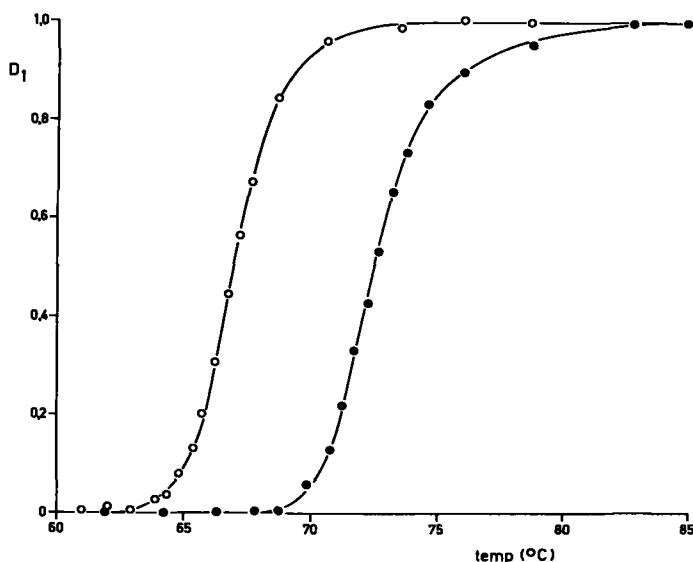


Fig. 3.2 Smeltcurven van T4- en T7-DNA..

○-○-○ T4-DNA

●-●-● T7-DNA

lost in 0,01 M fosfaatbuffer met daaraan toegevoegd 1 mM EDTA.

In fig. 3.3 zijn een aantal relaxatiecurven weergegeven van versgeïsoleerd T4-DNA voor verschillende waarden van D_1 . De grootte van de temperatuursprongen was zó gekozen, dat de extinctieverandering ten gevolge van de sprong ongeveer gelijk was over het gehele smeltgebied. Al spoedig bleek, dat de eigenschappen van de relaxatie afhankelijk waren van D_1 . Om de relaxatie als functie van D_1 te bestuderen is het dus gewenst een zo klein mogelijke, constante sprong te gebruiken. De meetnauwkeurigheid is echter groter naarmate de extinctieverandering groter is. Uit fig. 3.3 blijkt, dat met een sprong van $0,70 \pm 0,04^\circ\text{C}$ de extinctieverandering voldoende groot is over

het gehele smeltgebied. Alle volgende experimenten werden verricht met een sprong van deze grootte.

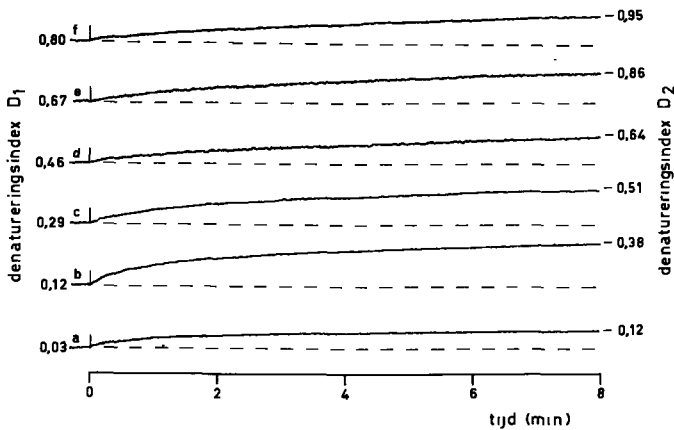


Fig. 3.3 Eerste deel van de registraties van de extinctie bij 260 nm na een temperatuursprong. T4-DNA in HMPEP
Gemiddelde aantal enkelstrengbreuken per molecuul 0,6.
De temperatuursprong bedroeg respectievelijk 1,05 ; 0,63 ; 0,47 ; 0,80 en 0,84°C voor de curven (a) tot en met (f). De denatureringsindices D_1 en D_2 zijn vermeld in de figuur.

In de inzet van fig. 3.4 is een relaxatiecurve afgebeeld van T4-DNA, waarin gemiddeld 0,6 enkelstrengbreuken per molecuul aanwezig zijn. De curve werd geanalyseerd volgens de methode van paragraaf 2.8. In fig. 3.4 is de verandering van de extinctie halflogaritmisch uitgezet tegen de tijd. De curve is niet recht. Het relaxatieproces kan dus niet worden voorgesteld door één e-macht. Een som van twee e-machten (d.i. $n = 2$ in formule 2.1) geeft daarentegen een goede benadering. Dit bleek algemeen te gelden voor alle relaxatie-experimenten. Dit is een aanwijzing, dat er twee afzonderlijke processen met verschillende relaxatietijd een rol spelen bij de denaturering. Het kan echter niet worden uitgesloten, dat de twee relaxatietijden in werkelijkheid twee groepen processen vertegenwoordigen, met relaxatietijden die binnen een groep weinig van elkaar verschillen. Binnen de meetnauwkeurigheid kunnen deze mogelijkheden niet worden onderscheiden. Bij het formuleren van de resultaten van de metingen zal daarom steeds worden aangenomen, dat de relaxatietijden twee

processen vertegenwoordigen. Later zal blijken (hoofdstuk 4), dat de relaxatie waarschijnlijk een gevolg is van twee groepen processen.

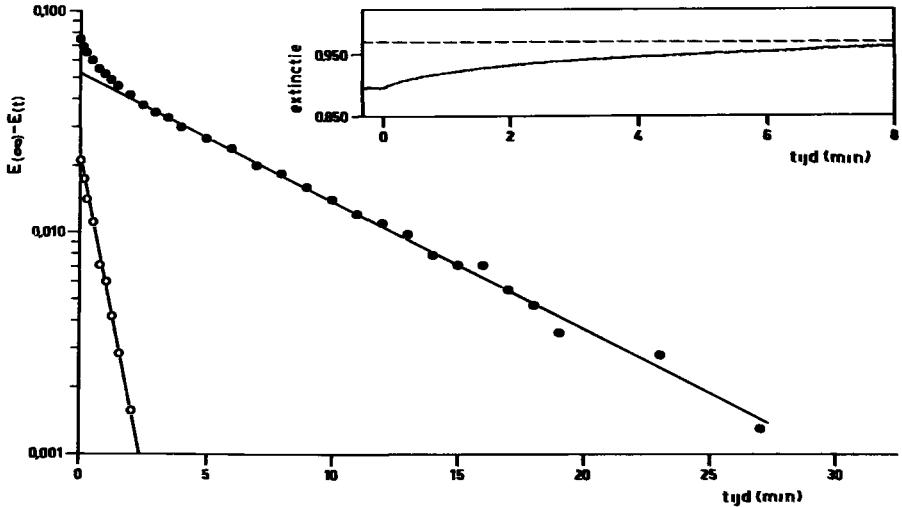


Fig. 3.4 Het voor verdamping gecorrigeerde verschil tussen de uiteindelijk bereikte extinctie $E(\infty)$ en de extinctie $E(t)$ op tijdstip t als functie van de tijd.

$t = 0$ correspondeert met het tijdstip van de temperatuursprong.

T4-DNA in HMPEP. $D_1 = 0,40$, $D_2 = 0,63$.

Gemiddelde aantal enkelstrengbreuken per molecuul 0,6.

●-●-● punten van de oorspronkelijke registratie na correctie voor verdamping.

○-○-○ punten die werden verkregen door aftrekking van de langzame component.

Inzet : het eerste deel van de registratie van de extinctie bij 260 nm van dit experiment.

De stippellijn geeft de voor verdamping gecorrigeerde waarde van de extinctie aan, die uiteindelijk wordt bereikt.

Alle experimenten bijeengenomen blijkt, dat zo er een derde proces of groep van processen is met een (gemiddelde) relaxatietijd die een orde verschilt van de twee gevonden tijden, de bijdrage tot de relaxatie hiervan op zijn hoogst 5% zou kunnen bedragen.

Het relaxatieproces wordt dus in goede benadering voorgesteld door twee gelijktijdig verlopende eerste-orde processen:

$$E(\infty) - E(t) = a_1 \exp(-t/\tau_1) + a_2 \exp(-t/\tau_2)$$

De twee rechten in fig. 3.4 corresponderen resp. met $\tau_1 = 46$ en $\tau_2 = 456$ sec, terwijl voor de waarde van f , de bijdrage tot de relaxatie van de component met de grootste relaxatietijd (d.i. $a_2/(a_1 + a_2)$), 0,71 wordt verkregen.

3.3.1. De relaxatietijden τ_1 en τ_2 en de fractie f als functie van D_1

In de figuren 3.5, 3.6 en 3.7 zijn τ_1 , τ_2 en de fractie f uitgezet tegen de denatureringsindex D_1 voor T4-DNA waarin het gemid-

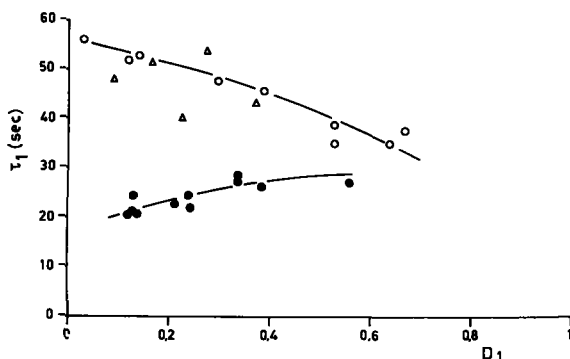


Fig. 3.5 De korte relaxatietijd τ_1 als functie van de denatureringsindex D_1 .
 o—o—o T4-DNA met gemiddeld 0,6 enkelstrengbreuken per molecuul
 Δ — Δ — Δ gebroken T4-DNA met een molekulgewicht van 18 MD
 ●—●—● T7-DNA
 Het DNA was opgelost in HMPEP, de temperatuursprong bedroeg 0,7°.

delde aantal enkelstrengbreuken 0,6 bedroeg. De punten in de figuur zijn het gemiddelde van 3 tot 5 waarnemingen. De reproduceerbaarheid van τ_2 bedroeg ongeveer 10%, zelfs als verschillende T4-DNA preparaten werden gebruikt. τ_1 was reproduceerbaar binnen 20%; deze geringere nauwkeurigheid is een gevolg van de extrapolatie- en subtractieprocedure, beschreven in 2.5. De fractie f was evenals τ_2 reproduceerbaar binnen 10%.

De korte relaxatietijd τ_1 neemt geleidelijk af van ca. 55 sec tot ongeveer 35 sec als D_1 toeneemt van 0,03 tot 0,7. De lange relaxatietijd τ_2 daarentegen heeft tot $D_1 = 0,4$ de constante waarde 450 sec en neemt vrij snel af als D_1 verder toeneemt.

De fractie f neemt bij benadering lineair toe met toenemende D_1 . De bijdrage van het langzame proces is dus groter naarmate de DNA molekulen meer gedenateerd zijn.

3.4. Relaxatie van door schuifspanningen gebroken T4-DNA

Om de relaxatie-eigenschappen van T7-DNA te kunnen vergelijken met die van T4-DNA van gelijk molekuulgewicht, moet het gebroken T4-DNA homogeen zijn en een molekuulgewicht van ongeveer 28 MD hebben. DNA preparaten, waarvan M_w ongeveer deze waarde had, bleken echter nog tamelijk inhomogeen te zijn. Uiteindelijk werd daarom voor de relaxatiemetingen een preparaat gebruikt waarvan M_w 18 MD bedroeg, en dat van alle onderzochte preparaten van gebroken T4-DNA het meest homogeen was. De verhouding M_w/M_n bedroeg voor dit materiaal 1,12.

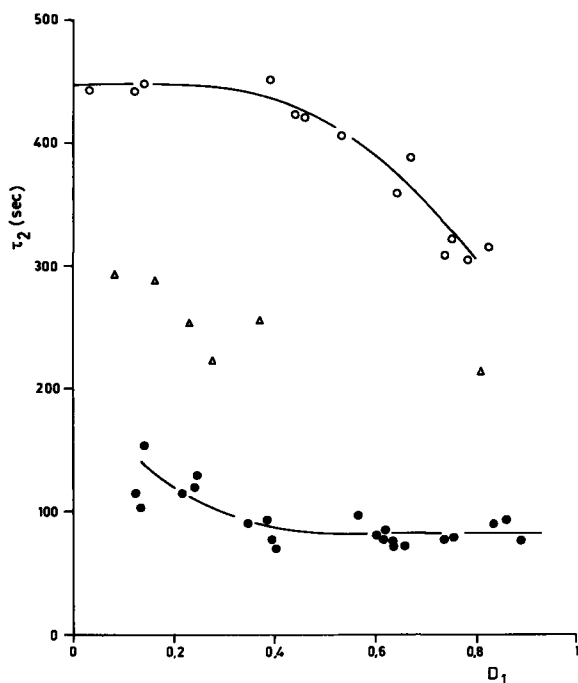


Fig. 3.6 De lange relaxatietijd τ_2 als functie van de denatureringsindex D_1 .
 ○-○-○ T4-DNA met gemiddeld 0,6 enkelstrengbreuken per molekuul
 △-△-△ gebroken T4-DNA met een molekuulgewicht van 18 MD
 ●-●-● T7-DNA
 Het DNA was opgelost in HMPEP, de temperatuursprong bedroeg $0,7^\circ$.

De resultaten van de relaxatie-experimenten zijn weergegeven in de figuren 3.5, 3.6 en 3.7. De relaxatietijd τ_2 van het gebroken T4-DNA is ongeveer 150 sec kleiner dan die van ongebroken T4-DNA, terwijl ook de fractie f kleiner is. Bovendien verschilt de grafiek f vs D_1 van die voor ongebroken materiaal.

Uit de boven vermelde waarnemingen volgt, dat de relaxatietijd τ_2 en de fractie f afhankelijk zijn van het molekuulgewicht. In de volgende paragraaf wordt de relaxatie besproken van T7-DNA, dat niet alleen in molekuulgewicht, doch ook in basensamenstelling van T4-DNA verschilt.

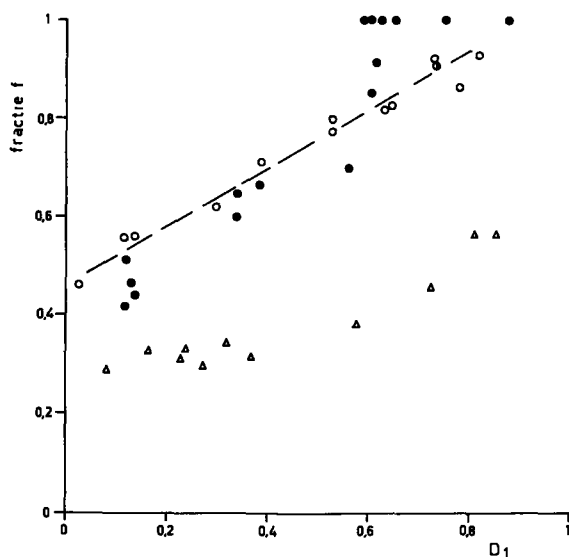


Fig. 3.7 De fractie f van de extinctieverhoging, die een gevolg is van het langzame proces, als functie van de denatureringsindex D_1 .
 o - o - o T4-DNA met gemiddeld 0,6 enkelstrengbreuken per molekuul
 Δ - Δ - Δ gebroken T4-DNA met een molekuulgewicht van 18 MD
 • - • - • T7-DNA
 Medium : HMPEP ; temperatuursprong : 0,7° .

3.5. Relaxatie van T7-DNA

Ook bij de relaxatie van T7-DNA kon de curve van de extinctie tegen de tijd beschreven worden door een som van twee eerste-orde processen. De langste relaxatietijd τ_2 bleek echter aanzienlijk kleiner te zijn dan die van T4-DNA en bedroeg slechts ca. 100 sec. Daar de extrapolatieprocedure bij de analyse van extinctiecurven onnauwkeuriger wordt naarmate τ_2 kleiner is, was de reproduceerbaarheid (ongeveer 20%) minder goed dan bij T4-DNA. Hoewel hierdoor het verband tussen τ_2 en D_1 minder nauwkeurig bepaald kon worden, blijkt uit de in fig. 3.6 afgebeelde waarnemingen toch duidelijk, dat de voor T4-DNA gevonden afneming van τ_2 bij T7-DNA minder uitgesproken is en plaatsvindt bij kleinere waarden van D_1 . Ook τ_1 , de relaxatietijd van het

snelle proces, is veel kleiner dan die van T4-DNA (fig. 3.5). Zoals uit de experimenten met gebroken T4-DNA blijkt, kunnen de kortere relaxatietijden van T7-DNA in vergelijking met die van T4-DNA slechts voor een gering deel worden verklaard door het kleinere molekulgewicht van T7-DNA.

Het verband tussen de fractie f en D_1 bij T7-DNA is aanvankelijk hetzelfde als dat voor T4-DNA, doch voor $D_1 > 0,5$ neemt f sterk toe en bereikt de waarde 1 bij $D_1 = 0,6$. De nauwkeurigheid waarmee f kan worden bepaald is echter slechts ca. 10%, zodat het verschil tussen T4- en T7-DNA niet reëel behoeft te zijn.

3.6. Renaturering

Doorgaans werd de DNA oplossing geruime tijd nadat het DNA in evenwicht was gekomen bij de eindtemperatuur van de sprong, weer afgekoeld tot de begintemperatuur T_b . Dit geschiedde door het elektrische verwarmingscircuit uit te schakelen en de koperen mantel van de cuvet aan te sluiten op de thermostaat waarmee T_b was ingesteld. De afkoeling van $0,7^\circ$ voltrok zich in ongeveer 4 minuten. De extinctie van de DNA oplossing werd voortdurend door de schrijver opgetekend. Daar de afkoeling enige tijd in beslag nam, was het niet mogelijk de relaxatie van de renaturering kinetisch te analyseren. Wel kon

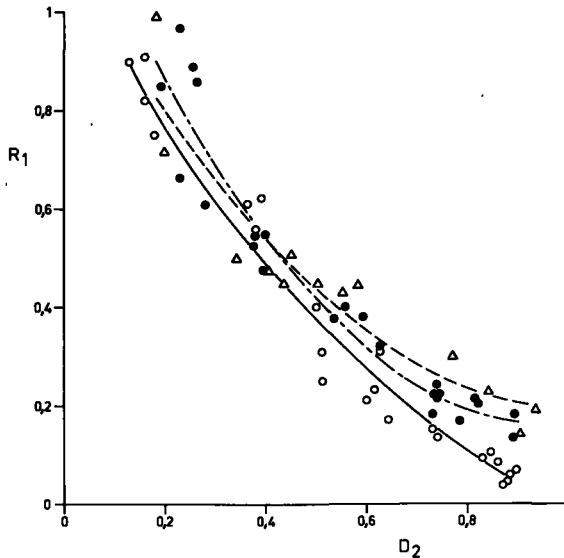


Fig. 3.8 De renatureringsindex R_1 als functie van de denatureringsindex D_2 .
 o - o - o en ——— T4-DNA met gemiddeld 0,6 enkelstrengbreuken per molekuul
 Δ - Δ - Δ en - - - gebroken T4-DNA met een molekulgewicht van 18 MD
 • - • - • en - · - · - T7-DNA

de tijd worden geschat die het DNA nodig had om opnieuw in evenwicht te komen bij de begintemperatuur. In alle gevallen was deze tijd kleiner dan 6 min.

In het algemeen was de renaturering niet volledig, d.w.z. E_3 was groter dan E_1 . De renatureringsindex R_1 bleek af te nemen met toenemende D_2 , zie fig. 3.8.

Indien, nadat de extinctie na afkoeling tot T_b constant was geworden, opnieuw de temperatuur werd verhoogd in een sprong van dezelfde grootte als de eerste, nam de extinctie weer toe en bereikte dezelfde waarde als na de eerste sprong. Dit gebeurde voor alle waarden van de eerste denatureringsindex D_1 , zoals wordt geïllustreerd in fig. 3.9a, waar de index D_2 is afgezet tegen D_4 . Werd na de tweede sprong weer afgekoeld tot T_b , dan nam de extinctie steeds af tot dezelfde waarde als na de eerste afkoeling, dus $D_3 = D_5$ (zie fig. 3.9b).

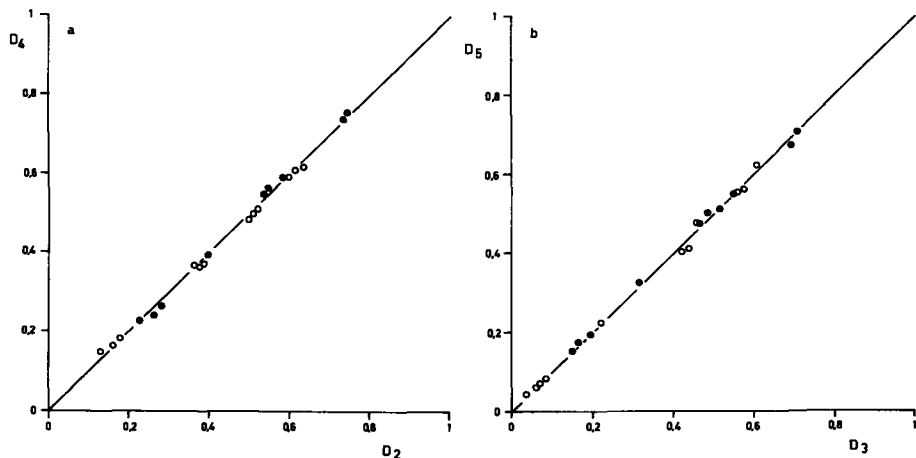


Fig. 3.9 (a) Het verband tussen de denatureringsindices D_2 en D_4 voor een aantal experimenten waarbij D_1 verschillende waarden had.
(b) Het verband tussen de denatureringsindices D_3 en D_5 voor verschillende waarden van D_1 .

T4-DNA in HMPEP, gemiddeld 0,6 enkelstrengbreuken per molecuul.

Hieruit volgt dat voor het gehele smeltgebied $R_2 = 1$. Werden hierna nog meer sprongen uitgevoerd met telkens tussentijdse afkoeling tot

de begintemperatuur, dan werd na de sprong steeds dezelfde waarde van de extinctie bereikt, terwijl de renatureerbare fractie na deze sprongen steeds 100% was. Na de eerste sprong renatureert blijkbaar een gedeelte van het DNA niet meer bij terugkeer tot de uitgangstemperatuur, terwijl het overblijvende deel reversibel denatureerbaar blijft.

De relaxatie na de tweede temperatuursprong kon alleen gevolgd worden in het eerste deel van het smeltgebied, omdat R_1 kleiner wordt met toenemende D_1 , waardoor de meetnauwkeurigheid ongunstig wordt beïnvloed. De lange relaxatietijd τ_2 bleek ongeveer 150 sec kleiner te zijn. De fractie f was na de tweede sprong ongeveer 10% kleiner voor $D_1 = 0,1$. Het verschil liep op tot ongeveer 30% voor $D_1 = 0,5$.

3.7. De invloed van enkelstrengbreuken op de relaxatie van T4-DNA

In hoofdstuk 1 is reeds uiteengezet, dat volgens de theorie van Crothers de relaxatietijd van DNA na een temperatuursprong wordt bepaald door de diffusie van kluwengebieden naar de uiteinden van het DNA molecuul. Indien de delen van een DNA molecuul aan weerszijden van een enkelstrengbreuk onafhankelijk ten opzichte van elkaar kunnen roteren, kan het molecuul zich sneller ontwinden, omdat kluwengebieden zich slechts behoeven te bewegen naar de plaats van de breuk.

Neemt men aan dat de verdeling van het aantal enkelstrengbreuken (p) over het DNA molecuul willekeurig is, dan is de gemiddelde afstand tussen twee van deze breuken evenredig met p^{-1} . Als voorts de relaxatietijd evenredig is met het kwadraat van de afstand tussen twee enkelstrengbreuken, is de gemiddelde relaxatietijd evenredig met p^{-2} als p groter is dan enkele breuken per molecuul (zie appendix B).

Het verband tussen relaxatietijd en het aantal enkelstrengbreuken werd experimenteel onderzocht met T4-DNA, waarin enkelstrengbreuken waren aangebracht zowel door verwarming van het DNA bij 60° in HMPEP als door bestraling van de DNA oplossing in een ^{60}Co gamabron (zie 2.7.2.). Met de verwarmingsmethode werden ca. 1,7 breuken per molecuul per uur aangebracht (fig. 2.3). De preparaten met gemiddeld meer dan 15 breuken per molecuul werden verkregen door bestraling.

De bepaling van de relaxatietijden werd wederom uitgevoerd met een temperatuursprong van $0,7^\circ$. De begintemperatuur werd voor de meeste experimenten vrijwel gelijk aan de smeltemperatuur gekozen ($D_1 = 0,54$), omdat de extinctieverandering, en dus de meetnauwkeurigheid, daar het grootst is. In enkele proeven had D_1 de waarde 0,08.

Evenals voor ongebroken T4-DNA bleken er voor T4-DNA dat enkelstrengbreuken bevatte, twee relaxatietijden op te treden. In fig. 3.10 is het verband weergegeven tussen τ_1 en τ_2 en de waarde van

p voor $D_1 = 0,54$. Uit de figuur blijkt duidelijk, dat de relaxatietijden zeker niet omgekeerd evenredig zijn met het kwadraat van p . De tijden nemen slechts zeer geleidelijk af met toenemende p . Zelfs voor ca. 900 breuken is τ_2 nog maar tot de helft van de oorspronkelijke waarde gedaald. Bij dit aantal breuken bleek het smeltpunt ongeveer $1,2^\circ$ lager te zijn dan dat van intact T4-DNA. Dit is in overeenstemming met de bevindingen van Boháček en Blačiček (48). Voor $p < 250$ werd geen verschuiving van het smeltpunt waargenomen. Kennelijk wordt DNA pas bij zeer grote aantallen enkelstrengbreuken gestabiliseerd. De begintemperatuur van de sprong werd verlaagd, indien dit nodig was om D_1 op 0,54 te brengen.

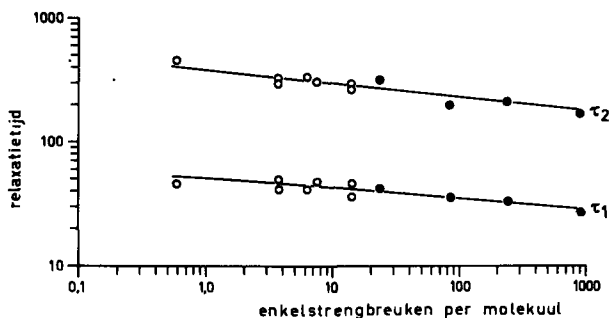


Fig. 3.10 De relaxatietijden τ_1 en τ_2 als functie van het gemiddelde aantal enkelstrengbreuken per molecuul (p).
T4-DNA in HMPEP, $D_1 = 0,54$.
o - o - o breuken geïnduceerd door verwarming bij 60°
● - ● - ● breuken geïnduceerd door ^{60}Co gammastraling

Fig. 3.11 toont de fractie (f) van de extinctieverandering die een gevolg is van het langzame proces als functie van p voor $D_1 = 0,54$ en $D_1 = 0,08$. f neemt aanvankelijk snel af met toenemende p en nadert vervolgens tot een constante waarde van ca. 0,35. Deze waarde is blijkbaar niet sterk afhankelijk van D_1 . De totale extinctieverandering ten gevolge van de temperatuursprong nam met toenemende

p geleidelijk af; zo was bij $p = 250$ $D_2 - D_1$ ongeveer 80% van de waarde bij $p = 0,6$.

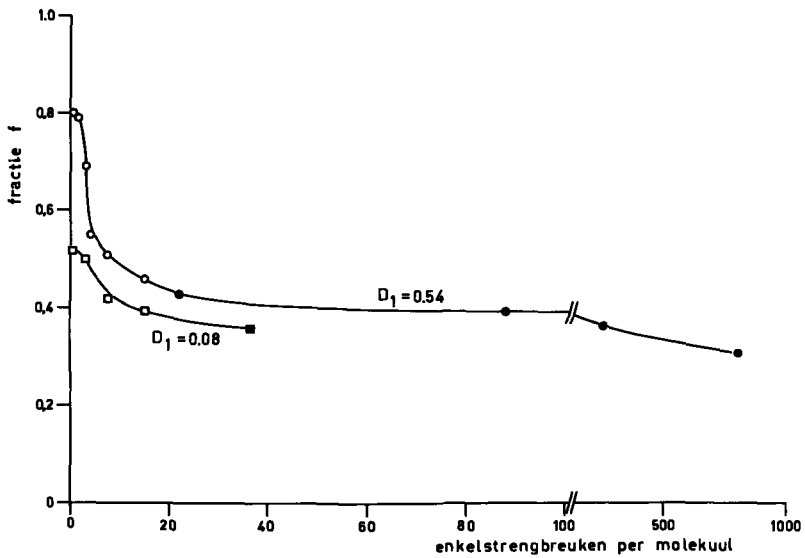


Fig. 3.11 De fractie f van de extinctieverhoging, die een gevolg is van het langzame proces, als functie van het gemiddelde aantal enkelstrengbreuken per molekuul (p).

T4-DNA in HMPEP

○-○-○ en □-□-□ breuken geïnduceerd door verwarming bij 60° ,
 D_1 : 0,54 respectievelijk 0,08

●-●-● en ■-■-■ breuken geïnduceerd door ^{60}Co gammastraling,
 D_1 : 0,54 respectievelijk 0,08

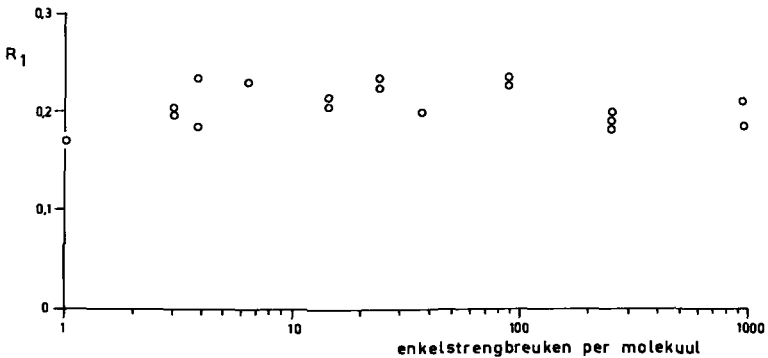


Fig. 3.12 De renatureringsindex R_1 als functie van het gemiddelde aantal enkelstrengbreuken per molekuul (p).

T4-DNA in HMPEP, $D_1 = 0,54$.

○-○-○ breuken geïnduceerd door verwarming bij 60°

●-●-● breuken geïnduceerd door ^{60}Co gammastraling

Tenslotte is in fig. 3.12 R_1 afgezet tegen p . Uit de figuur blijkt dat binnen de meetnauwkeurigheid R_1 onafhankelijk is van p voor p groter dan 10.

3.8. Samenvatting en discussie

De belangrijkste uitkomsten van de in de voorgaande paragrafen besproken proeven zijn:

- de relaxatie kan ontleed worden in twee eerste-orde processen, waarbij de bijdrage van een mogelijke derde component minder dan 5% is.
- de relaxatietijden van de twee processen zijn afhankelijk van D_1 , de mate waarin het molekuul gedenatureerd is voor het begin van de relaxatie. Bij T4-DNA is de grootste relaxatietijd τ_2 in de eerste helft van het smelttraject nagenoeg constant en neemt vervolgens af met toenemende D_1 . De kleinste relaxatietijd neemt al bij het begin van het smelten af met toenemende D_1 . Bij T7-DNA neemt τ_2 eerst af met toenemende D_1 en wordt vervolgens constant. τ_1 neemt langzaam toe met D_1 .
- f , de bijdrage van het langzame proces tot de relaxatie, neemt toe met D_1 .
- de relaxatietijden zijn enigszins afhankelijk van het molekuulgewicht M , maar voor M tussen 20 en 120 MD zeker niet evenredig met M^2 .
- de relaxatieparameters τ_1 , τ_2 en f zijn sterk afhankelijk van de basensamenstelling van het DNA.
- R_1 , de fractie van de extinctieverandering die na afkoeling tot de begintemperatuur reversibel is, neemt af met toenemende D_1 . Na de tweede en volgende identieke sprongen is de renatureringsindex gelijk aan 1.
- enkelstrengbreuken in het DNA hebben slechts een geringe invloed op de grootte van τ_1 en τ_2 .
- f neemt snel af voor enkele enkelstrengbreuken per molekuul en wordt vrijwel constant als het aantal breuken groot is.
- R_1 is onafhankelijk van het aantal enkelstrengbreuken.

Uit de waarnemingen kunnen enkele conclusies worden getrokken die de theorie van de relaxatie betreffen. De relaxatietijd die voor ongebroken T4-DNA ($M = 130$ MD) wordt gevonden, door de door Crothers gemeten tijden voor T2-DNA met een molekuulgewicht kleiner dan 20 MD te extrapoleren volgens een kwadratische afhankelijkheid van het molekuulgewicht, bedraagt ca. 10^4 sec. Dat is zeer veel groter dan de lange relaxatietijd van T4-DNA, die hoogstens 450 sec is. Het gemiddelde aantal enkelstrengbreuken per molekuul dat in het gebruikte materiaal aanwezig was (0,6), is veel te klein om deze discrepantie te kunnen verklaren. Voor ongebroken T4-DNA zijn de relaxatietijden 1,5 maal zo groot als voor gebroken T4-DNA met een mole-

kuulgewicht van 18 MD. Ook daaruit blijkt dat aan de evenredigheid tussen de relaxatietijd en M^2 , die uit de theorie van Crothers volgt, niet wordt voldaan. Het verband tussen de relaxatietijden en D_1 is eveneens niet in overeenstemming met deze theorie, die een maximum bij $D_1 = 0,5$ voorspelt.

De verhouding van τ_1/τ_2 wijkt niet veel af van de door Crothers voorspelde waarde; zij is echter niet constant doch neemt toe van 8,2 voor $D_1 = 0,3$ tot 10,2 voor $D_1 = 0,8$. De fractie f , volgens bovengenoemde auteur constant, neemt vrijwel lineair toe met D_1 .

Na afkoeling tot de begintemperatuur T_b van de sprong is het DNA niet in staat de oorspronkelijke toestand weer aan te nemen. Het DNA renatureert pas volledig bij veel lagere temperaturen dan T_b , ondanks het feit, dat een gedeelte van het molecuul nog een geordende helixstructuur heeft. Omdat dit gedeelte, evenals de fractie f , toeneemt met toenemende D_1 , is het vermoedelijk geassocieerd met het langzame relaxatieproces.

De geringe invloed van enkelstrengbreuken op de grootte van de twee relaxatietijden leidt tot één van de twee volgende, alternatieve, conclusies: óf de diffusietheorie is niet van toepassing voor de ontwindings van DNA, óf de windingen kunnen het molecuul niet verlaten ter plaatse van een enkelstrengbreuk. De laatste conclusie zou gerechtvaardigd zijn, indien de twee delen van het molecuul aan weerszijden van een enkelstrengbreuk niet onafhankelijk van elkaar zouden kunnen roteren. Voor ontwindings van het molecuul te ener zijde van een breuk wordt namelijk niet alleen vereist dat de gebroken streng om de ongebroken streng roteert, maar tevens dat het gedeelte van de ongebroken streng aan die zijde om zijn as draait. Er moet dus in de buurt van de breuk vrije draaiing mogelijk zijn om tenminste één van de covalente bindingen van de ongebroken keten. Een nucleotide-groep bevat twee C-O, één C^{4'}-C^{5'} en twee P-O bindingen, waarom in beginsel rotatie kan optreden. Morgan (49) heeft aangetoond, dat zelfs in de kluwenconfiguratie de draaiing om deze bindingen niet volkomen vrij is. De groepen aan weerszijden van de bindingen blijken verscheidene voorkeursposities t.o.v. elkaar in te nemen. De energiebarrières tussen deze posities zijn echter slechts van de orde van 1-3 kcal/gmol (50), d.i. slechts weinig meer dan de gemiddelde energie RT . Rotatie van twee delen van de ongebroken keten t.o.v. elkaar om een van deze bindingen zal daarom niet ernstig worden gehinderd.

De interactie tussen de twee delen van het molecuul aan weerszijden van een enkelstrengbreuk via de hydratatiemantel die het molecuul omringt, zou ook van invloed kunnen zijn op de draaiing van deze delen. Hoewel de uitgebreidheid van deze watermantel niet goed bekend is, duiden NMR experimenten erop, dat slechts 10 gewichtsprocenten water aan het DNA is gebonden (51, 52), d.i. minder dan twee watermolekullen per nucleotide. Het is niet waarschijnlijk dat deze geringe hoeveelheid de rotatie belemmert.

Bij de extractie van DNA volgens de fenolmethode blijken er in de oplossing polyamines te kunnen voorkomen (53, 54, 55). Deze

polyamines worden sterk aan het DNA gebonden (55). Het is niet denkbeeldig, dat een DNA streng aan weerskanten van een breuk wordt bijeengehouden door een polyaminemolekuul. Om deze mogelijkheid te onderzoeken werd het gehalte aan polyamines van de voor de relaxatie-experimenten gebruikte DNA oplossing bepaald. Deze analyse, uitgevoerd door de heer W.C.M. Zwennis volgens de methode van Ames en Dubin (53), wees uit dat er slechts één polyaminemolekuul per 40 nucleotiden aanwezig was. Dit is veel te weinig om de geringe invloed op de relaxatie van willekeurig toegebrachte enkelstrengbreuken te kunnen verklaren.

Uit het bovenstaande volgt, dat er geen reden is aan te nemen dat windingen het DNA molekuul niet kunnen verlaten ter plaatse van een enkelstrengbreuk. De conclusie die overblijft is, dat de in de literatuur beschreven diffusietheorieën niet van toepassing zijn op de relaxatie van DNA.

HOOFDSTUK 4

EEN FENOMENOLOGISCH MODEL VOOR DE RELAXATIE VAN DNA

4.1. Inleiding

De in het vorige hoofdstuk verzamelde waarnemingen kunnen niet bevredigend worden verklaard met de in hoofdstuk 1 besproken theorieën. Deze waren gebaseerd op macromoleculaire eigenschappen van het DNA, zoals de viskeuze weerstand in de oplossing, de verdeling in helix- en kluwengebieden e.d. De denaturering wordt echter bepaald door interacties tussen de afzonderlijke basenparen. Zou in elke evenwichtssituatie de toestand van ieder basenpaar vastliggen, dan zou bij een verstoring van het evenwicht de overgang van de basenparen naar de nieuwe evenwichtstoestand in principe kunnen worden beschreven met behulp van één reactieconstante voor elk basenpaar. Worden alleen wisselwerkingen tussen basenparen die naast elkaar liggen beschouwd (naaste-buur wisselwerkingen), dan zou men kunnen volstaan met een aantal elementaire reactieconstanten, bijv. één voor het overgaan naar de ongebonden toestand van een AT paar dat geflankeerd wordt door twee GC paren, één voor een AT paar tussen een GC en een AT paar in enz.

Het in formule vastleggen van de toestand van alle basenparen in een DNA molecuul (voor T4-DNA ca. $2 \cdot 10^5$) is een schier onmogelijke taak. Wel kan worden aangegeven wat de gemiddelde toestand is, waarin de paren zich bevinden, m.a.w. wat de waarschijnlijkheid is, dat één basenpaar, of een reeks basenparen, zich in een bepaalde toestand of configuratie bevindt. Hiervoor kunnen methoden worden gebruikt uit de statistische mechanica. Is de evenwichtstoestand van het DNA molecuul op deze manier met voldoende precisie gekarakteriseerd en zijn de differentiaalvergelijkingen die het overgaan van de basenparen naar de nieuwe evenwichtstoestand beschrijven oplosbaar, dan kan de relaxatie bij bekende elementaire reactieconstanten volledig worden beschreven en kunnen de eigenschappen van de relaxatie als functie van molekulgewicht, basensamenstelling e.d., worden voorspeld. Uit het volgende blijkt, dat dit programma voor natuurlijk DNA nog niet uitvoerbaar is.

Er zijn vele theoretische beschouwingen gepubliceerd, die de beschrijving van de evenwichtsconfiguratie van lineaire macromolekullen

ten doel hebben (57-78). Het molekuul wordt daarbij in het algemeen opgevat als een keten van subeenheden, die elk in twee verschillende toestanden kunnen voorkomen. De subeenheden kunnen van de ene in de andere toestand overgaan door veranderingen in het milieu waarin het molekuul zich bevindt. De overgang wordt coöperatief genoemd, als de verandering van de toestand van een subeenheid wordt beïnvloed door de toestand van andere subeenheden in het molekuul. Heeft een subeenheid voorkeur voor die toestand waarin ook de naburige subeenheden zich bevinden, dan ontstaat er een stelling overgang, d.w.z. een geringe verandering in het milieu is voldoende om een grote verandering in de conformatie van het molekuul te veroorzaken; dit is o.a. het geval bij het denatureren van DNA.

De conformatie van de keten van subeenheden als functie van de uitwendige parameters kan volledig worden beschreven, indien de partitiefunctie van het systeem bekend is. In de genoemde beschouwingen wordt deze functie op verschillende manieren en bij verschillende onderstellingen berekend. Een goed overzicht hiervan wordt gegeven door Applequist (79). Tot nu toe zijn alleen voor eenvoudige modelsystemen, zoals eenstrengige polypeptiden, goede resultaten verkregen. De partitiefunctie werd hierbij gebaseerd op het ééndimensionale model van Ising (80, 81), waarin een keten elementairmagneetjes wordt beschouwd die twee standen kunnen innemen t.o.v. een magnetisch veld. Gewoonlijk wordt alleen de naaste-buur wisselwerking tussen de subeenheden in aanmerking genomen (59). Voor dubbelstrengige molekulen waarin de strengen om elkaar zijn gewonden, komt dit zeker niet met de werkelijkheid overeen. Door topologische restricties kunnen de subeenheden (bij DNA de basenparen) ook invloeden ondergaan van eenheden die ver weg liggen. Een andere complicatie bij dubbelstrengig DNA is het feit dat de stabiliteit van de basenparen die gelegen zijn direct naast een kluwengebied, afhankelijk is van de grootte van dit gebied. Zimm (60) heeft een methode aangegeven om de laatste eigenschap in rekening te brengen. In wezen is dit een uitbreiding van het door hem en Bragg gegeven model voor polypeptiden (59). Het DNA molekuul wordt hierbij opgevat als een ladder waarvan de stijlen gevormd worden door de suikerfosfaatgroepen en de sporten door de basenparen. Bij dit laddermodel (ook wel het ritssluitingmodel genoemd) wordt evenwel nog steeds verondersteld, dat de stabiliteit van gebonden basenparen in het helixgebied zelf alléén afhankelijk is van de naaste burens. Het is in principe mogelijk de behandeling van Zimm en die van Lifson en Zimm (62), waarbij op een gewijzigde en iets kortere manier voor hetzelfde model de partitiefunctie wordt berekend, uit te breiden tot wisselwerkingen tussen verder weg gelegen burens (82). Bij beide methoden zijn de mathematische bewerkingen dan echter zeer veel complexer, terwijl bovendien de grootte van dergelijke wisselwerkingen niet bekend is.

Het model van Zimm en Bragg, waarvan een zeer goede bespreking werd gegeven door Birshtein en Ptitsyn (83), is door enkele auteurs gebruikt als basis voor beschouwingen over de tijdsafhankelijk-

heid van de helix-kluwenovergang. Go (84) kwam tot de slotsom dat deze afhankelijkheid voor oneindig lange molekulen gegeven wordt door een stelsel van vier differentiaalvergelijkingen, die aanleiding geven tot vier relaxatietijden. Dit resultaat is slechts experimenteel te verifiëren, als deze tijden een orde van grootte verschillen. Schwarz (82, 85) heeft daarom een andere benadering van het relaxatieprobleem gegeven, eveneens met het model van Zimm en Bragg als uitgangspunt. Hierbij wordt een gemiddelde relaxatietijd berekend, die is gedefinieerd als de helling van de relaxatiecurve op het tijdstip $t = 0$ (85, 86). De gemiddelde relaxatietijd alsmede de breedte van het relaxatiespectrum (2.8.) blijkt een functie te zijn van het molekuulgewicht en van het aantal basenparen dat zich aan het begin van de relaxatie in de helixtoestand bevindt. Ook deze theorie is in zijn huidige vorm alleen toe te passen op de helix-kluwenovergang van polypeptiden. De theorie van Schwarz heeft het voordeel dat de gemiddelde relaxatietijd en de breedte van het spectrum ook voor complexe relaxatiespectra op eenvoudige wijze experimenteel zijn te bepalen (86). Daar staat tegenover dat alle informatie die het experiment geeft, wordt samengevat in slechts twee parameters, waardoor nauwelijks enig inzicht wordt verkregen in de individuele processen die aan de relaxatie ten grondslag liggen.

De tot nu toe genoemde modellen hebben betrekking op materiaal waarin maar één soort subeenheden voorkomt. Een aantal auteurs hebben een behandeling gegeven van het Ising model waarin twee soorten subeenheden voorkomen, voor DNA dus GC en AT paren (64, 67-71, 77). Alleen voor bepaalde eenvoudige (bijv. om en om GC en AT) en voor geheel lukrake verdelingen van deze twee soorten over het molekuul kan in het geval van naaste-buur wisselwerkingen de partitiefunctie en daaruit de smeltcurven worden berekend.

De tijdsafhankelijkheid van de overgang tussen twee evenwichtstoestanden van het Ising model met twee soorten subeenheden is in detail bestudeerd door Goel (87). Alleen voor een alternerende reeks van GC en AT paren werd een analytische uitdrukking voor de relaxatie verkregen. In dit speciale geval wordt de relaxatie beschreven door één e -macht.

Craig en Crothers (88) hebben het bovenvermelde model van Schwarz gebruikt om voor de helix-kluwenovergang van polypeptiden relaxatiecurven te genereren met behulp van een elektronische rekenmachine. Er wordt een relaxatiecurve verkregen zonder dat men beschikt over een analytische uitdrukking voor deze curve. Deze methode is voorts nog niet geschikt voor een modelsysteem dat op het veel ingewikkelder DNA molekuul lijkt. In de bovenstaande theorieën wordt aangenomen, dat de basenparen óf gebonden, óf ongebonden zijn, zonder tussentoestanden. Het hyperchrome effect, dat een gevolg is van het verbreken van de bindingen tussen de basen zou dan een alles-of-niets proces zijn, m.a.w. elk basenpaar levert in de gebonden toestand een bepaalde bijdrage tot het hyperchrome effect, die tot nul wordt gereduceerd zodra de basen in de niet-gebonden toestand over-

gaan. De fractie van het totale hyperchrome effect dat bij een bepaalde toestand behoort, wordt dus gelijk gesteld aan de fractie ongebonden basenparen in het molecuul. In de volgende paragraaf wordt uiteengezet, dat er aanwijzingen zijn dat de bijdrage tot het hyperchrome effect van gebonden basenparen afhankelijk is van de uitwendige omstandigheden.

Uit het bovenstaande blijkt, dat de statistisch-mechanische theorieën vooralsnog niet gebruikt kunnen worden bij het beschrijven van de relaxatie van de extinctie van DNA tijdens de helix-kluwen-overgang. In de paragrafen 4.3. en 4.4. wordt daarom getracht een fenomenologische beschrijving van de relaxatie te geven, die uitgaat van de macromoleculaire structuur van DNA.

4.2. Het hyperchrome effect

De extinctie van een oplossing van dubbelstrengig DNA bij 260 nm is ca. 41% kleiner dan de som van de extincties van de samenstellende mononucleotiden. Dit is het zogenaamde hypochrome effect. Wordt dubbelstrengig DNA gedenatureerd, dan stijgt de extinctie met ca. 40%. Dit wordt het hyperchrome effect genoemd.

Een verklaring voor het hypochrome effect is gegeven door Tinoco (89), Rhodes (90) en DeVoe en Tinoco (91). Het oscillerende elektrische veld van het licht waaraan de DNA oplossing wordt blootgesteld, induceert elektrische dipolen in de chromofore groepen (de basen), waardoor een deel van het licht geabsorbeerd wordt. De grootte van de absorptie is afhankelijk van de wisselwerking tussen de geïnduceerde dipolen in de verschillende basen. Deze interactie is een functie van de afstand tussen de basenparen en van de stand die de basen ten opzichte van elkaar innemen. Tinoco heeft deze wisselwerking benaderd door een dipool-dipool interactie, waarvan de sterkte gegeven wordt door de tensor

$$G_{ij} = \frac{1}{r_{ij}^3} \left[\bar{e}_i \cdot \bar{e}_j - \frac{3 (\bar{e}_i \cdot \bar{r}_{ij}) (\bar{e}_j \cdot \bar{r}_{ij})}{r_{ij}^2} \right]$$

waarin $\bar{e}_i$ en $\bar{e}_j$ de dipoolvectoren in de i -de respectievelijk de j -de base voorstellen en $\bar{r}_{ij}$ in richting en grootte gelijk is aan de afstand tussen hen.

Als de oriëntatie van de dipolen willekeurig is, is er geen netto effect van de interactie; dit geldt bijv. voor een oplossing van nucleotiden. Zijn de basen daarentegen opgenomen in de regelmatige, geordende structuur van het dubbelstrengige DNA, dan blijkt de onderlinge interactie aanleiding te geven tot een geringere absorptie (hypochrome effect) (92).

Hoewel de dipool-dipool benadering vermoedelijk niet helemaal correct is voor de wisselwerking tussen naast elkaar gelegen basen

(93, 94, 95), worden de kwalitatieve aspecten van deze theorie van het hypochrome effect algemeen aanvaard en mag worden aangenomen, dat het hypo- en dus ook het hyperchrome effect afhankelijk is van de configuratie van de basenparen en daardoor van de helixparameters (lengte en diameter van de helix, afstand en hoek tussen twee opeenvolgende basenparen enz.) (96-99). Dit houdt in dat naarmate de structuur van het DNA meer geordend is, het hypochrome effect groter zal zijn.

Het is niet mogelijk een grens aan te geven tussen orde en wanorde. Zelfs in gedenatureerde toestand bezit het DNA nog een zekere mate van orde. De extinctie bij 260 nm van een mengsel van de mononucleotiden waaruit het DNA is opgebouwd, is ca. 70% hoger dan de extinctie van het intacte DNA, terwijl de extinctieverhoging die optreedt bij volledige denaturering van DNA slechts ongeveer 40% is van de extinctie van het dubbelstrengige materiaal (100). Het verschil is kennelijk afkomstig van de interactie tussen naast elkaar gelegen basen van de enkele streng en mogelijk ook nog van die tussen basen van verschillende strengen. Deze interactie is afhankelijk van de omstandigheden. Zo vertoont het enkelstrengige, ringvormige DNA van de bacteriofaag Φ X174 een hyperchrom effect van enkele procenten bij verwarming in een buffer die 0,025 M fosfaat bevat (101), terwijl bij verwarming in 0,2 M NaCl dit effect ongeveer 20% bedraagt (102).

De geordende structuur van het dubbelstrengige DNA is eveneens afhankelijk van het milieu. Zo is bijv. in het dubbelstrengige, circulaire DNA van de bacteriofaag λ het aantal basenparen per winding afhankelijk van de temperatuur (103). Uit elektronenmicroscopische waarnemingen concludeerden Lang en medewerkers dat de lengte van DNA molekulen toeneemt met afnemende zoutsterkte (104). Blijkbaar kunnen de onderlinge posities van de basenparen binnen zekere grenzen afwijken van die, welke bepaald zijn met behulp van röntgendiffractie aan kristallijne draden DNA. Het is daarom redelijk te veronderstellen, dat de bijdrage per basenpaar tot het hyperchrome effect niet een vaste waarde heeft, maar op continue wijze varieert als functie van een of andere helixparameter, zoals de hoek of de afstand tussen twee opeenvolgende basenparen. De verandering in de betreffende parameter door een kleine wijziging van het milieu zal groter zijn naarmate het molecuul minder stabiel is. Het "lossier" worden van de helix zal juist in het smeltgebied een belangrijke bijdrage kunnen geven tot de verhoging van de extinctie.

4.3. De structuur van gedeeltelijk gedenatureerd DNA

Een belangrijk punt in de theorie van Crothers is de overweging dat, "macroscopisch" gezien, een DNA molecuul uit een aantal helix- en kluwengebieden zou bestaan. Voor grote molekulen is dit inderdaad waarschijnlijk. Uit de in 4.1. besproken theorieën volgt, dat in molekulen die uit één soort subeenheden bestaan, de even-

wichtsconfiguraties in het overgangsgebied bestaan uit alternerende helix- en kluwengebieden. In werkelijkheid is DNA heterogeen. De gebieden met een hoog gehalte aan AT paren zijn minder stabiel en nemen daardoor eerder de kluwenconfiguratie aan (9, 105). Dit heeft tot gevolg dat de statistische verdeling van de helix- en kluwengebieden voor natuurlijk DNA niet overeen zal komen met die, welke berekend is voor homogeen DNA of voor DNA met een willekeurige verdeling van de GC en AT paren over het molecuul.

De veronderstelling van Crothers, dat ook in natuurlijk DNA bij de denaturering afwisselend helix- en kluwengebieden voorkomen, wordt gesteund door enkele experimenten.

Beer en Thomas (106) vonden dat gedeeltelijk gedenameerd DNA onder de electronenmicroscopie amorphe plekken (knoedels) vertoont, die over het gehele molecuul zijn verdeeld. Deze knoedels werden verondersteld gedenameerde gedeelten van het DNA molecuul te zijn. Bartl en Boublik (107) hebben DNA bij temperaturen rond het smeltpunt op een rooster verstoven en het preparaat vervolgens met een electronenmicroscopie bekeken. Ook hier werden knoedels waargenomen, waarvan het aantal en de grootte toenamen met de temperatuur waarbij het DNA was verstoven. Pas bij verstuviging bij 10° boven het smeltpunt bleken de strengen volledig te zijn gescheiden. Inman (108) heeft met behulp van de techniek van Kleinschmidt (109) met de electronenmicroscopie knoedels en lussen van enkelstrengig materiaal zichtbaar gemaakt in het dubbelstrengige DNA van de bacteriophage λ , nadat het materiaal bij temperaturen in de buurt van het smeltpunt gedurende 10 min was verhit in aanwezigheid van 10% formaldehyde (deze stof verhindert renaturering bij afkoeling). Ook hier namen het aantal en de grootte toe met de temperatuur. Aangenomen werd, dat de AT-rijke gedeelten van DNA als nucleatiekernen voor dergelijke knoedels en lussen fungeren. Beers en medewerkers (110) namen door enzymatische degradatie aan beide uiteinden van T7-DNA een gedeelte van een streng weg en substitueerden vervolgens op deze plaatsen base-analogen, waarbij de andere streng als matrijs diende. Door variatie in de keuze der base-analogen kon de stabiliteit van de uiteinden zowel groter als kleiner gemaakt worden dan die van het middengedeelte van het molecuul. In beide gevallen bleek het minst stabiele gedeelte bij een lagere temperatuur te denatureren dan het andere deel. Dit is een doorslaggevend bewijs, dat in een DNA molecuul de minst stabiele gebieden kunnen denatureren zonder dat de uiteinden eerst in de kluwenconfiguratie behoeven over te gaan.

De vraag rijst nu, wat de structuur is van dergelijke gedenameerde, kluwenachtige gebieden in het midden van een DNA molecuul. De electronenmicroscopische foto's van "gedenameerd" DNA laten zowel gebieden zien waarin de strengen niet gescheiden zijn (107), als gebieden waarin min of meer ringvormige structuren voorkomen. De laatste lijken uit enkele strengen te bestaan (108). Het is echter lang niet zeker of de morfologie van het opgeloste DNA molecuul bewaard blijft bij de fixering die noodzakelijk is alvorens waarnemingen

met de electronenmicroscop kunnen worden uitgevoerd, zelfs niet als de subtiële techniek van Kleinschmidt wordt gebruikt. Het is zeker niet uitgesloten, dat in oplossing de strengen van het DNA molecuul in de gedenatureerde toestand om elkaar gewonden blijven. Dit is namelijk het geval bij het ringvormige, gesloten, dubbelstrengige RF molecuul, de "replicative form" van de bacteriofaag Φ X174. RF kan wel gedenatureerd worden, doch de strengen kunnen niet ontwinden (111). Het hyperchrome effect is hierbij ongeveer 35% (112). De sedimentatiecoëfficiënt van gedenatureerd RF hangt sterk af van de zoutsterkte (113). Dit gedrag komt overeen met dat van enkelstrengig DNA, wat erop wijst, dat het DNA de dubbelstrengige helixconformatie verloren heeft. Niettemin moeten de strengen nog een groot aantal malen om elkaar zijn gewonden. Men kan zich voorstellen dat in lineaire molekulen van grote lengte volledige ontwinding van een kluwengebied ergens middenin het molecuul vertraagd of verhinderd wordt door de viskeuze wrijving tussen het roterende molecuul en het oplosmiddel. Het kluwengebied zou dan vrijwel volledig gedenatureerd kunnen zijn, terwijl er toch nog een (mogelijk groot) aantal windingen in voorkomt.

Op grond van bovenstaande overwegingen worden nu de hier volgende veronderstellingen gemaakt. Een gedeeltelijk gedenatureerd DNA molecuul bestaat uit een aantal kluwengebieden, afgewisseld door gebieden in de helixtoestand. De basen in de kluwenstukken zijn ongepaard; deze stukken bezitten geen of een zeer gering hypochroom effect vergeleken met het volledig gedenatureerde, enkelstrengige DNA. De strengen in de kluwengebieden kunnen in meer of mindere mate om elkaar zijn gewonden. In de helixgebieden zijn de basen gepaard. De strengen bevinden zich in de schroeflijnconfiguratie, maar zijn minder "stijf" om elkaar gewonden dan in de oorspronkelijke, niet-gedenatureerde toestand.

De helix- en de kluwengebieden kunnen worden gekarakteriseerd door de parameter W , het aantal windingen per eenheid van lengte, gemeten langs de as van het molecuul. W kan worden gebruikt als maat voor de denatureringstoestand van willekeurige gedeelten van het molecuul en is een continue variabele, afhankelijk van de plaats x op de as. Als de evenwichtstoestand verstoord is, bijv. door een temperatuurstijging, is W ook een functie van de tijd, m.a.w. $W = W(x, t)$.

In een suspensie van gedeeltelijk gedenatureerde DNA molekulen vormt de som van de bijdragen van de helix- en kluwengebieden tot de extinctieverhoging het fractionele hyperchrome effect D_1 . Deze bijdragen zijn afhankelijk van W . Dit kan als volgt worden geformuleerd:

$$\frac{\epsilon_k - \epsilon}{\epsilon_k - \epsilon_h} = f \left(\frac{W}{W_h} \right) \quad (4.1)$$

Hierin is ϵ de extinctiecoëfficiënt per eenheid van lengte langs de as van het molecuul. De index k verwijst naar de toestand waarin het molecuul volledig is gedenatureerd, d.w.z. waarbij het maximale hy-

perchrome effect is bereikt. De index h duidt op de helixtoestand waarin W maximaal is.

De functie f kan niet exact worden berekend, omdat de posities van en de interactie tussen de basen bij een bepaald windingsgetal W niet bekend zijn. Het ligt voor de hand te veronderstellen, dat het effect op de absorptie van een kleine verandering in de wisselwerking tussen de basen het grootst is als de afstand tussen de basen zo klein mogelijk is, d.w.z. als de waarde van W niet veel verschilt van W_h . De functie f zou dan de vorm van curve (b) in figuur 4.1 kunnen hebben. In deze figuur stelt curve (a) de extinctie-

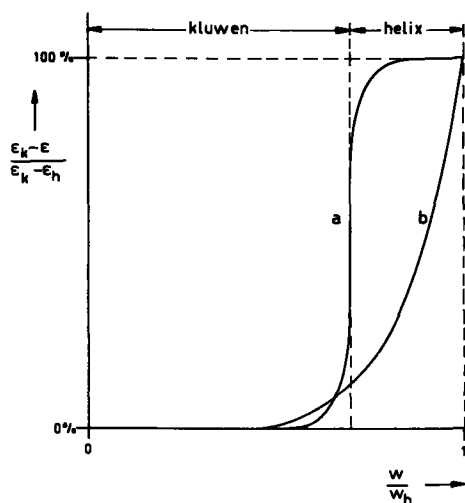


Fig. 4.1 Twee verschillende mogelijkheden voor het verband tussen het fractionele hypochrome effect van DNA en het aantal windingen per eenheid van lengte.

- (a) Sprongwijze verandering van de hypochrome waarde bij de helix-kluwenovergang.
- (b) De hypochrome waarde hangt sterk af van het losser worden van de helixstructuur. De curve komt overeen met een functie van de vorm $f = \left(\frac{W}{W_h}\right)^c$, waarbij in het geval van deze schematische voorstelling $c = 6$ werd gebruikt.

verandering voor van een alles-of-niets proces, zoals dat tot nu toe in de literatuur werd verondersteld plaats te vinden bij denaturering. Bij een bepaalde waarde van W , dicht bij W_h , zouden de bindingen tussen de basen worden verbroken en diensgevolge zou het hypochrome effect tot nul worden gereduceerd. Curve (b), die het gedrag van de extinctieverhoging als functie van W weergeeft volgens het huidige model, wijkt aanmerkelijk van curve (a) af. Een verband als

door curve (b) gegeven, kan worden voorgesteld door de relatie:

$$f\left(\frac{W}{W_h}\right) = \left(\frac{W}{W_h}\right)^c \quad (4.2)$$

waarin c groter is dan 1.

De hypothese dat in het smeltgebied ook de gedeelten met een helixconfiguratie kunnen bijdragen tot het hyperchrome effect, heeft ingrijpende gevolgen voor het mechanisme dat verondersteld wordt ten grondslag te liggen aan de relaxatie van de extinctie van een DNA oplossing na een verandering in een uitwendige parameter. In de volgende paragraaf wordt dit nader toegelicht. Voor het gemak zal voor de verandering in het milieu een verhoging van de temperatuur worden genomen. Kwalitatief geldt de beschouwing over het relaxatiemechanisme evenzeer voor veranderingen van andere uitwendige parameters, zoals de pH van de oplossing.

4.4. Het mechanisme van de relaxatie van de extinctie na een verhoging van de temperatuur

Uitgaande van de in de vorige paragraaf voorgestelde structuur van gedeeltelijk gedenatureerd DNA, is het effect van een geringe temperatuurverhoging tweemaal. In de helixgebieden van het DNA (voortaan korthedshalve helices genoemd) zal door de verhoogde thermische beweging de orde afnemen en de gemiddelde afstand tussen de basen groter worden. Tegelijkertijd zijn er gebieden, die door de temperatuurverhoging juist voldoende energie verkrijgen om in de kluwenconfiguratie over te kunnen gaan. Deze overgang naar de kluwenconfiguratie zal, althans in een reeds gedeeltelijk gedenatureerd molecuul, voornamelijk plaatsvinden aan de uiteinden van de helices, daar de uiteinden de geringste stabiliteit bezitten en omdat de kluwengebieden vooral in AT-rijke gedeelten van het DNA zullen voorkomen (105). De vorming van nieuwe kluwengebieden (voortaan kortweg kluwens genoemd, waarmede niet wordt bedoeld dat deze gebieden werkelijk als statistische kluwens kunnen worden beschreven) midden in de helices wordt daarom voorlopig buiten beschouwing gelaten.

Beide processen, de lengteverandering van de helices en het "instorten" van de uiteinden, geven een bijdrage tot het hyperchrome effect, doordat W kleiner wordt. Zoals in 4.3. reeds werd opgemerkt, is het mogelijk dat in de kluwenvorm nog een aantal windingen aanwezig is zonder dat dit aanleiding geeft tot een waarneembaar hypochroom effect. Dit betekent, dat de windingen die de helix verlaten bij het instorten van de uiteinden van de helices, zich kunnen verdelen over de aangrenzende kluwen, terwijl toch de bijdrage tot het hyperchrome effect vrijwel volledig is. Men kan zich voorstellen dat in een later stadium, indien dit energetisch voordeliger is, de win-

dingen uit de kluwens verwijderd worden door rotatie van het molekuul, waarbij de helices als stijve staven zouden kunnen worden beschouwd. Dit proces heeft dan geen merkbare invloed op de extinctie en kan dus niet met optische methoden worden gevolgd.

Een verandering van W gaat noodzakelijkerwijze gepaard met draaiing van gedeelten van het molekuul. Daar de energiewinst ten gevolge van deze draaiing niet veel groter is dan de gemiddelde energie kT (114), is deze draaiing, zoals door Fixman is aangetoond (14), in beginsel een diffusieproces. $W(x,t)$ kan worden vergeleken met een concentratie. Wordt de plausibele veronderstelling gemaakt, dat het aantal windingen dat per tijdseenheid door een bepaalde dwarsdoorsnede van het molekuul beweegt, evenredig is met de gradiënt van $W(x,t)$, dan geldt voor deze diffusie de bekende diffusievergelijking

$$\frac{\partial W(x,t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial W(x,t)}{\partial x} \right) \quad (4.3)$$

De oplossing van deze vergelijking voor geschikte randvoorwaarden kan worden gesubstitueerd in (4.1). Na integratie over de lengte van het molekuul wordt een uitdrukking verkregen voor de tijdsafhankelijkheid van de extinctie, d.w.z. voor de relaxatie.

Indien de veronderstelling juist is dat de relaxatie van de extinctie een gevolg is van het transport van windingen over slechts een beperkt gebied, is het voor de beschrijving van de diffusie voldoende één helix met één aangrenzende kluwen te beschouwen. In figuur 4.2 is zo'n gedeelte van een molekuul schematisch weergegeven.

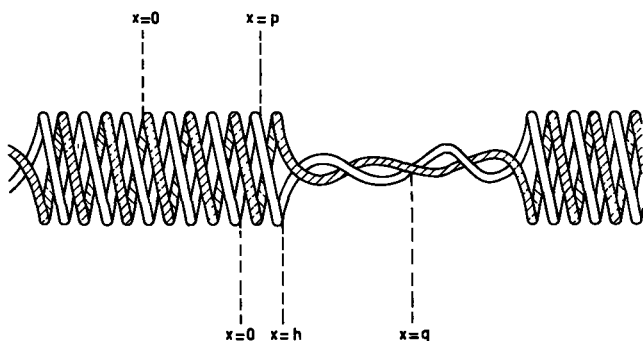


Fig. 4.2 Schematische weergave van een helix- en een aangrenzend kluwengedeelte. De symbolen in de figuur worden verklaard in het onderschrift van figuur 4.3a, 4.3b.

De diffusiecoëfficiënt is in dit deel van het molekuul niet constant. Ten gevolge van de grotere stijfheid van de helix zal de diffusiecoëfficiënt in de helix (D_H) groter zijn dan die in de kluwen (D_K), d.w.z. in de helix zal de diffusie sneller verlopen.

Na een temperatuurverhoging neemt W in de helix af van de beginwaarde W_0 tot de evenwichtswaarde W_1 . Hierbij wordt dus verondersteld dat in de begin- en eindtoestand W onafhankelijk is van de plaats in de helix, d.w.z. de helix homogeen is. De evenwichtswaarde W_1 zal aan de uiteinden direct worden aangenomen. De helix-configuratie is daar evenwel door de temperatuurverhoging instabiel geworden, waardoor een aantal windingen in de aangrenzende kluwen zal diffunderen. Ook voor de kluwen wordt aangenomen dat voor $t = 0$ en $t = \infty$ W onafhankelijk is van x , waarbij $W(x,0) = W_0^i$.

Bij de diffusie van windingen in de kluwen beweegt de grens tussen helix en kluwen zich in de richting van het midden van de helix. Dit geeft aanleiding tot mathematische complicaties. Er is geen analytische oplossing van de diffusievergelijking beschikbaar voor diffusie in een gebied van eindige afmetingen bestaande uit twee delen, waarin de diffusiecoëfficiënten verschillend zijn en waarbij het scheidingsvlak zich in de loop van het proces verplaatst (115). Teneinde toch een analytische oplossing te kunnen geven voor de relaxatie, zal de diffusie in de helix en in de kluwen apart worden beschouwd, waarbij wordt aangenomen dat de lengteverandering van de helix tijdens de diffusie verwaarloosbaar is. Dit is alleen geoorloofd als $(W_0 - W_1)/W_0$ klein is, hetgeen voor kleine temperatuursprongen het geval zal zijn vanwege de eerder gemaakte veronderstelling, dat een kleine verandering in W reeds een relatief grote verandering in ϵ tot gevolg heeft.

Voor de diffusie in de helix (voortaan proces A genoemd) gelden nu de randvoorwaarden:

$$W = W_0 \quad \text{voor} \quad -p < x < p \quad \text{en} \quad t = 0 \quad (4.4a)$$

$$W = W_1 \quad \text{voor} \quad x = \pm p \quad \text{en} \quad t \geq 0 \quad (4.4b)$$

waarin $2p$ de lengte van de helix is. De diffusie wordt verondersteld symmetrisch te zijn t.o.v. het midden van de helix, d.i. $x = 0$. In fig. 4.3a is de begin- en eindtoestand van het diffusieproces schematisch in beeld gebracht. De eerste randvoorwaarde duidt aan, dat de helix in de begintoestand overal W_0 windingen per eenheid van lengte heeft; de tweede, dat na de storing de eindwaarde W_1 aan de uiteinden onmiddellijk wordt bereikt.

De randvoorwaarden van het diffusieproces in de kluwen (proces B genoemd) zijn (zie fig. 4.3b):

$$\text{op tijdstip } t = 0 \quad \text{is} \quad W = W_1 \quad \text{voor} \quad 0 < x < h \quad \text{en}$$

$$W = W_0^i \quad \text{voor} \quad h < x < q \quad (4.5a)$$

$$\text{voor } t \geq 0 \quad \frac{\partial W}{\partial x} = 0 \quad \text{bij} \quad x = 0 \quad \text{en} \quad x = q \quad (4.5b)$$

Hierin is $2q$ de lengte van het kluwengebied in de nieuwe evenwichts-

toestand en h de lengte van het stuk van de helix dat aan één uiteinde in de kluwentoestand overgaat. De eerste voorwaarde geeft aan, dat W in het stuk h van de helix al direct de waarde W_1 heeft. Dit is een gerechtvaardigde benadering, omdat $D_h > D_c$ en voor kleine

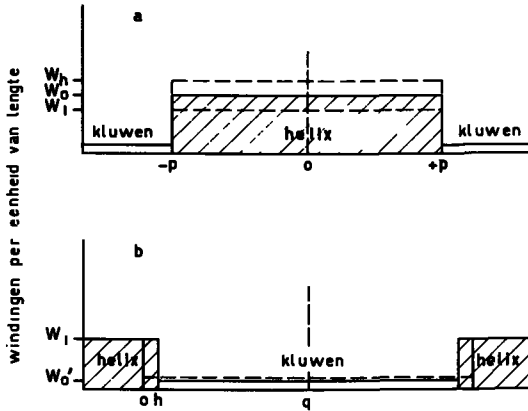


Fig. 4.3 (a) De randvoorwaarden van het diffusieproces in een helixgedeelte. Proces A is het verminderen van het aantal windingen per eenheid van lengte in de helix van W_0 tot W_1 ten gevolge van een diffusieproces met diffusiecoëfficiënt D_h . Bij $x = 0$ (midden van het helixgedeelte) is $\frac{\partial W}{\partial x} = 0$. Bij $x = \pm p$ (uiteinden van de helix) verandert W_0 onmiddellijk in W_1 op tijdstip $t = 0$.

(b) De randvoorwaarden van het diffusieproces in een kluwengedeelte. Proces B is de overgang van een klein deel ter lengte h aan het uiteinde van de helix in de kluwenconfiguratie. De windingen diffunderen met een diffusiecoëfficiënt D_k in de kluwen. Voor dit proces geeft $x = 0$ het punt aan in de helix waar $\frac{\partial W}{\partial x} = 0$. Het midden van de kluwen ligt bij $x = q$, ook hier is de gradiënt van W gelijk aan nul. Op tijdstip $t = 0$ is $W = W_1$ voor $0 < x < h$ en $W = W'_0$ voor $h < x < q$, waarbij $W'_0 < W_1$.

temperatuursprongen W_0 niet veel groter is dan W_1 . Er wordt aangenomen, dat ook de kluwen homogeen is. De tweede voorwaarde betekent, dat er geen transport van windingen is door de doorsneden bij $x = 0$ en $x = q$. De kluwen wordt verondersteld symmetrisch te zijn om het midden, d.i. om $x = q$.

Nadat zowel voor proces A als voor proces B de functie $W(x,t)$ door het oplossen van de diffusievergelijking (4.3) is gevonden, wordt een uitdrukking verkregen voor de extinctie per eenheid van lengte ter plaatse x en op tijdstip t door substitutie van $W(x,t)$ in de volgende

uit (4.1) en (4.2) verkregen relatie

$$\epsilon(x,t) = \epsilon_k - \left(\frac{W(x,t)}{W_h} \right)^c \cdot (\epsilon_k - \epsilon_h) \quad (4.6)$$

De bijdrage tot de extinctie van het beschouwde stuk DNA bestaande uit één helix- en één kluwengebied wordt gevonden door (4.6) te integreren over beide gebieden. De bijdrage van het gehele molecuul bestaat dan uit de som van de bijdragen van alle stukken in het molecuul, bestaande uit een helix plus een aangrenzende kluwen. In de volgende paragraaf wordt de mathematische uitwerking van dit programma gegeven.

4.5. Afleiding van een uitdrukking voor de optische relaxatie van DNA

De diffusievergelijking voor proces A, waarbij de diffusiecoëfficiënt constant wordt verondersteld, luidt

$$\frac{\partial W(x,t)}{\partial t} = D_h \frac{\partial^2 W(x,t)}{\partial x^2} \quad (4.7)$$

De oplossing van deze vergelijking met randvoorwaarden (4.4a) en (4.4b) wordt gegeven door (116):

$$W(x,t) = W_1 - (W_1 - W_0) \cdot \frac{4}{\pi} \sum_n \quad (4.8)$$

waarin

$$\sum_n = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \cdot \exp(-D_h (2n+1)^2 \pi^2 t / 4p^2) \cdot \cos \frac{(2n+1)\pi x}{2p}$$

Substitutie van (4.8) in (4.6) leidt tot

$$\epsilon(x,t) = \epsilon_k - \Delta\epsilon \left(\frac{W_1}{W_h} \right)^c \cdot \left[1 - \frac{W_0 - W_1}{W_1} \cdot \frac{4}{\pi} \sum_n \right]^c \quad (4.9)$$

waarin $\Delta\epsilon = \epsilon_k - \epsilon_h$. De som over n in (4.9) is altijd kleiner dan $\frac{\pi}{4}$. Dit is te verifiëren met behulp van (4.8) voor $t = 0$ en $t = \infty$. Daar $(W_1 - W_0)/W_1 \ll 1$ voor kleine temperatuursprongen, mogen dus in de ontwikkeling van het binomium de termen van de tweede en hogere orde in eerste benadering worden verwaarloosd. Wordt de zo verkregen

uitdrukking voor $\epsilon(x, t)$ afgetrokken van $\epsilon(x, \infty)$ dan ontstaat

$$\epsilon(x, \infty) - \epsilon(x, t) = \Delta \epsilon \left(\frac{W_1}{W_h} \right)^c \cdot c \cdot \frac{W_o - W_1}{W_1} \cdot \frac{4}{\pi} \sum_n \quad (4.10)$$

Integratie van $-p$ tot $+p$ geeft nu de verandering in de extinctie ten gevolge van proces A:

$$E(\infty) - E(t) \Big|_A = 2p \left(\frac{W_1}{W_h} \right)^c \cdot \Delta \epsilon \cdot c \cdot \frac{W_o - W_1}{W_1} \cdot \frac{8}{\pi^2} \sum'_n \quad (4.11)$$

waarin

$$\sum'_n = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \cdot \exp(-D_h (2n+1)^2 \pi^2 t / 4p^2)$$

Voor proces B wordt $W(x, t)$ gegeven door de oplossing van de diffusie-vergelijking (4.7) waarin D_h is vervangen door D_k , met de randvoorwaarden (4.5a) en (4.5b). Deze oplossing luidt (116)

$$W(x, t) = \frac{h}{q} W_1 + W_o' \frac{q - h}{q} + (W_1 - W_o') \cdot \frac{2}{\pi} \sum_m \quad (4.12)$$

waarin

$$\sum_m = \sum_{m=1}^{\infty} \frac{1}{m} \exp(-D_k m^2 \pi^2 t / q^2) \cdot \sin \frac{m\pi h}{q} \cdot \cos \frac{m\pi x}{q}$$

De toeneming van de extinctie $E(t) - E(0)$ ten gevolge van de diffusie van een gedeelte van de helix in de aangrenzende kluwen wordt gegeven door

$$\begin{aligned} E(t) - E(0) &= \int_0^q \left\{ \epsilon(x, t) - \epsilon(x, 0) \right\} dx \\ &= \int_0^h \left\{ \epsilon(x, t) - \epsilon(x, 0) \right\} dx + \int_h^q \left\{ \epsilon(x, t) - \epsilon(x, 0) \right\} dx \\ &\quad I_1 \qquad \qquad \qquad I_2 \end{aligned} \quad (4.13)$$

Substitutie van (4.6) en (4.12) in de eerste integraal I_1 geeft

$$I_1(t) = \left(\frac{W_1}{W_h}\right)^c \cdot \Delta\epsilon \cdot \left[h - \int_0^h \left\{ 1 + \frac{W_1 - W'_0}{W_1} \left(\frac{h-q}{q} + \frac{2}{\pi} \sum_m \right) \right\}^c dx \right] \quad (4.14)$$

Substitutie van $t = 0$ in (4.12) en gelijkstellen van $W(x, 0)$ aan W_1 geeft $\frac{2}{\pi} \sum_m(0) = \frac{q-h}{h}$ voor $0 < x < h$. Hieruit volgt dat $\left| \frac{h-q}{q} + \frac{2}{\pi} \sum_m \right|$ altijd kleiner is dan $\frac{q-h}{q}$ en gelijk is aan nul voor $t = 0$. De integrand kan daarom in eerste instantie gelijkgesteld worden aan de eerste twee termen van de binomiumontwikkeling. Voor grote waarden van t is deze benadering vermoedelijk niet helemaal correct, de gemaakte fout is echter moeilijk te schatten. Integratie levert dan

$$I_1(t) = \left(\frac{W_1}{W_h}\right)^c \cdot \Delta\epsilon \cdot c \cdot \frac{W_1 - W'_0}{W_1} \left[h \frac{q-h}{q} - \frac{2q}{\pi^2} \sum'_m \right] \quad (4.15)$$

waarin

$$\sum'_m = \sum_{m=1}^{\infty} \frac{1}{m^2} \cdot \sin^2 \frac{m\pi h}{q} \cdot \exp(-D_k m^2 \pi^2 t / q^2)$$

De tweede integraal I_2 is gelijk aan

$$\begin{aligned} I_2(t) &= \left(\frac{W'_0}{W_h}\right)^c \cdot \Delta\epsilon \cdot (q-h) - \int_h^q \left\{ \epsilon(x, t) - \epsilon_k \right\} dx \\ &= \left(\frac{W'_0}{W_h}\right)^c \cdot \Delta\epsilon \left[(q-h) - \int_h^q \left\{ 1 + \frac{W_1 - W'_0}{W'_0} \left(\frac{h}{q} + \frac{2}{\pi} \sum_m \right) \right\}^c dx \right] \end{aligned} \quad (4.16)$$

Uit (4.12) volgt dat voor $t = 0$ en $W(x, t) = W'_0$ geldt $\frac{h}{q} + \frac{2}{\pi} \sum_m(0) = 0$. Voorts is voor $t = \infty$ $\sum_m(\infty) = 0$. De integrand mag dus worden benaderd door de twee eerste termen van de binomiumontwikkeling als

$\frac{h}{q} < \frac{W'_0}{W_1 - W'_0}$, d.w.z. voor kleine temperatuursprongen; dan immers

heeft $\frac{h}{q}$ een kleine waarde. Integratie levert dan

$$I_2(t) = \left(\frac{W'_0}{W_h}\right)^c \cdot \Delta\epsilon \cdot c \cdot \frac{W_1 - W'_0}{W'_0} \left(h \frac{h-q}{q} - \frac{2q}{\pi^2} \sum'_m \right) \quad (4.17)$$

Sommering van I_1 en I_2 geeft $E(t) - E(0)$. Wordt deze uitdrukking afgetrokken van die voor $E(\infty) - E(0)$, dan verkrijgt men voor de toename van de extinctie ten gevolge van proces B

$$E(\infty) - E(t) \Big|_B = \frac{W_1^{c-1} + W_o'^{c-1}}{W_h^c} \cdot \Delta\epsilon \cdot c \cdot (W_1 - W_o') \cdot \frac{2q}{\pi^2} \sum_m' \quad (4.18)$$

Dit resultaat moet nog met een factor twee worden vermenigvuldigd omdat tot nu toe slechts de helft van een kluwen in beschouwing werd genomen. Daar $W_o' < W_1$ en $c \gg 1$ geldt bij benadering

$$E(\infty) - E(t) \Big|_B = 2q \cdot \left(\frac{W_1}{W_h} \right)^c \cdot \Delta\epsilon \cdot c \cdot \frac{W_1 - W_o'}{W_1} \cdot \frac{2}{\pi^2} \sum_m' \quad (4.19)$$

De som van (4.11) en (4.19) geeft de bijdrage tot de verandering in de extinctie van een helix met de aangrenzende kluwen. $\sum_n'$ convergeert snel, de bijdrage van de eerste term tot de totale waarde van de som is ruim 80%. Van $\sum_m'$ is de eerste term eveneens het grootst, hoewel voor zeer kleine h/q een beperkt aantal volgende termen ook nog een bijdrage geven. Voor het verdere betoog wordt ook van deze som alleen de eerste term genomen. In eerste-orde benadering geldt dus voor de extinctieverandering:

$$E(\infty) - E(t) \Big|_{A+B} = A e^{-t/\tau_A} + B e^{-t/\tau_B} \quad (4.20)$$

waarin

$$A = 2p \cdot \left(\frac{W_1}{W_h} \right)^c \cdot \Delta\epsilon \cdot c \cdot \frac{W_o - W_1}{W_1} \cdot \frac{8}{\pi^2} \quad (4.21)$$

$$B = 2q \cdot \left(\frac{W_1}{W_h} \right)^c \cdot \Delta\epsilon \cdot c \cdot \frac{W_1 - W_o'}{W_1} \cdot \frac{2}{\pi^2} \cdot \sin^2 \frac{\pi h}{q} \quad (4.22)$$

$$\tau_A = \frac{4p^2}{D_h \cdot \pi^2} \quad (4.23)$$

$$\tau_B = \frac{q^2}{D_k \cdot \pi^2} \quad (4.24)$$

In beginsel moet nu (4.20) worden gesommeerd over alle in de oplossing aanwezige helix- en kluwenstukken om de totale extinctieverandering van de DNA oplossing te verkrijgen. Dit betekent dat voor elk helix- plus aangrenzend kluwenstuk de relaxatietijden en de coëfficiënten A en B bekend moeten zijn. Het ontstaan van kluwens in AT-rijke gebieden heeft tot gevolg, dat de kluwens en de overblijvende helices onderling betrekkelijk homogeen van samenstelling zullen zijn, waardoor W_0 , W_0' en W_1 op een bepaald punt in het smeltgebied voor alle stukken ongeveer dezelfde waarde zullen hebben. Het is echter onwaarschijnlijk, dat de afmetingen van de helices, en die van de kluwens, onderling gelijk zijn. Deze afmetingen zullen immers sterk afhangen van de uitgebreidheid van de verschillende AT-rijke gebieden in het molecuul. De verdeling van dergelijke gebieden over het molecuul is niet bekend. Vooralsnog is daarom een kwantitatieve berekening van de relaxatietijden niet mogelijk.

De voornaamste uitkomst van de wiskundige behandeling is, dat het voorgestelde model leidt tot twee relaxatietijden τ_A en τ_B (of in ieder geval een beperkt aantal voor het geval dat de gemaakte benaderingen niet correct mochten zijn), waarbij het relaxatieproces in de helices proces A werd genoemd en dat in de kluwens proces B. In het volgende hoofdstuk zal blijken, dat de experimentele resultaten in kwalitatieve overeenstemming zijn met de theorie.

HOOFDSTUK 5

BESPREKING VAN DE EXPERIMENTELE RESULTATEN IN HET KADER VAN HET MODEL

Het meest opvallende aspect van de relaxatie, namelijk het voorkomen van twee relaxatietijden, is in overeenstemming met het model. Een aantal andere eigenschappen van de relaxatie die uit de theoretische benadering van het vorige hoofdstuk volgen, zullen nu puntsgewijs met de experimentele resultaten worden vergeleken.

5.1. τ_1 als functie van D_1

De relaxatietijd τ_A heeft voor helices van ongelijke lengte niet dezelfde waarde. De gemeten relaxatietijd zal daarom een gemiddelde zijn van alle voorkomende τ_A 's. De bijdrage van één of van enkele τ_A 's die weinig verschillen, kan echter zo overheersen, dat er experimenteel slechts één τ wordt gevonden. τ_1 is dus evenredig met de gemiddelde waarde van p^2/D_h . Als D_1 toeneemt, wordt p^2 snel kleiner, maar ook D_h zal afnemen, omdat de structuur van de helices steeds losser wordt. Men verwacht dus dat τ_1 zal afnemen met toenemende D_1 , maar minder snel dan p^2 . Dit komt globaal overeen met de waarnemingen, afgebeeld in fig. 3.5.

5.2. τ_2 als functie van D_1

De relaxatietijd τ_2 zou evenredig moeten zijn met de gemiddelde waarde van q^2/D_k . Daar D_k waarschijnlijk nagenoeg onafhankelijk van q is, zal de waarde van τ_2 hoofdzakelijk afhangen van q^2 . Het is niet noodzakelijk, dat de gemiddelde waarde van q toeneemt als de denaturering voortschrijdt. Er kunnen ook nieuwe kluwenstukken midden in de helixgebieden worden gevormd. Dan neemt wel de fractie van het DNA molecuul dat zich in de kluwenconfiguratie bevindt toe, maar de gemiddelde waarde van q kan bij benadering constant blijven, mits er in de uitgangstoestand reeds kluwens aanwezig waren. Helemaal in het begin van de denaturering is dit niet het geval; de kluwens zullen dan echter voornamelijk aan de uiteinden van het mole-

kuul worden gevormd. Dergelijke eindeffecten zijn in het huidige model niet beschouwd. De vorming van een nieuwe kluwen in een helix vereist weliswaar rotatie van minstens één van de overblijvende helixgedeelten, doch de hierbij te overwinnen viskeuze weerstand zal bij korte helixgedeelten te verwaarlozen zijn.

Als er ergens in het midden van een helix een winding in de kluwenconfiguratie overgaat, moet er aan het uiteinde van het draaiende deel van de helix weer een winding bij komen. Het is energetisch gezien niet waarschijnlijk dat het zover komt, want de winding die in de helixconfiguratie moet overgaan, bevond zich al in de kluwenconfiguratie en zal dus eerder verder de kluwen in diffunderen. Dit houdt in, dat de vorming van nieuwe kluwens wordt bepaald door de diffusiesnelheid waarmee windingen in de reeds bestaande kluwens kunnen diffunderen. De relaxatietijd van het vormingsproces zal dus ongeveer dezelfde waarde hebben als τ_B .

Het feit dat τ_2 constant is totdat de helft van het DNA is gedatureerd, zou er dan op wijzen, dat er aanvankelijk voornamelijk nieuwe kluwens worden gevormd, zonder dat de bestaande zich belangrijk uitbreiden. Voor $D_1 > 0,4$ neemt τ_2 af, niettegenstaande het feit dat q in het laatste deel van het smeltgebied uiteindelijk toch groter moet worden. Wellicht betekent dit, dat de bij de afleiding van (4.24) gemaakte veronderstelling dat de windingen in de eindtoestand uniform over de gehele kluwen zijn verdeeld, niet meer geldt voor grote q . Voor de diffusie van windingen uit de helix in de kluwen zou dan slechts een bepaald gedeelte van de kluwen, grenzend aan de helix, moeten worden beschouwd.

5.3. f als functie van D_1

In paragraaf 4.5. werd op grond van de grotere stijfheid van de helix verondersteld dat $D_h > D_k$, waardoor de diffusie van windingen in de helix (proces A) het snelle proces zou zijn. De relatieve bijdrage van het langzame proces tot de relaxatie (f) zal dan op ongeveer dezelfde wijze van D_1 afhangen als het quotient $B/(A+B)$. A is evenredig met p en B met q . Naarmate de denaturering voortschrijdt nadert de gemiddelde waarde van p tot nul waardoor $B/(A+B)$ tot 1 nadert. f zal dus op het einde van de denaturering gelijk aan 1 worden. Dit is voor ongebroken DNA inderdaad het geval, zoals blijkt uit fig. 3.7. Dit geeft dus steun aan de onderstelling dat D_h groter is dan D_k . Zou namelijk de diffusie in de kluwen sneller verlopen dan in de helix, dan zou de fractie van de extinctie die verandert met de langzame relaxatietijd τ_2 , tot nul naderen als D_1 tot 1 nadert.

5.4. Renaturering

De onvolledige renaturering, die optreedt nadat de temperatuur

van de DNA oplossing weer tot de beginwaarde is teruggebracht, zou te wijten kunnen zijn aan een onvolledig herstel van de helixstructuur in de kluwens. Het is bekend dat volledige renaturering van de gescheiden DNA strengen pas optreedt bij temperaturen die ongeveer 25° lager liggen dan T_m (117). Deze hysteresis is een gevolg van twee elkaar tegenwerkende processen. Eerst moeten er kernen van stabiele basenparen worden gevormd; dit gaat beter naarmate de temperatuur lager is. Niet alle gevormde kernen echter bestaan uit basen die in het oorspronkelijke, natieve DNA ook met elkaar waren gepaard. Voor volledige renaturering moet de foutieve basenparing weer ongedaan worden gemaakt. Dit is het tweede proces, dat beter verloopt bij hogere temperatuur. Het is dus niet zo verwonderlijk, dat de gedeelten van het DNA die zich in de kluwenconfiguratie bevinden, niet volledig renatureren bij afkoeling tot de beginwaarde van de temperatuursprong. Daarentegen zullen de helixgebieden wel volledig renatureren, omdat de basen daar nog steeds in paren voorkomen. Hieruit volgt dat het reversibele gedeelte van de extinctieverhoging voornamelijk afkomstig is van de helices en dat de renaturering dus zal verlopen volgens een eerste-orde proces met een relaxatietijd van dezelfde orde van grootte als τ_1 . Indien deze relaxatietijd 1 min bedraagt, is in 4 min de eindtoestand tot op ca. 2% bereikt. Gevonden werd, dat de renaturering zich voltrok in ongeveer 6 min. Neemt men hierbij in aanmerking dat de afkoeling 3 tot 4 min in beslag nam, dan is deze tijd goed in overeenstemming met de veronderstelling dat de renaturering voornamelijk in de helixgebieden plaatsvindt. Doordat de afkoeling niet momentaan geschiedde, kon helaas niet worden onderzocht of de renaturering inderdaad volgens een eerste-orde proces verliep.

Indien de renaturering een gevolg is van het inkrimpen der helices, zal de fractie R_1 afnemen als het aantal en de grootte van de kluwengebieden in het molekuul stijgt, d.w.z. afnemen met toenemende D_2 , en zal R_1 tot nul naderen als D_2 tot 1 nadert. Uit fig. 3.8 volgt dat deze conclusie juist is.

De reversibele fractie van de op een bepaald moment bereikte extinctieverhoging zal kleiner zijn naarmate het proces B zijn voltooiing dichter is genaderd. Dit werd inderdaad waargenomen in enkele proeven waarbij de relaxatie voortijdig was onderbroken door afkoeling tot T_b .

Zou er in de kluwens helemaal geen renaturering plaatsvinden, dan zou R_1 gelijk moeten zijn aan de fractie $A/(A + B) = 1 - f$. Fig. 5.1 toont, dat dit voor de tweede helft van de smeltcurve bij benadering het geval is. In het begin van het smeltproces is R_1 groter dan $1 - f$. Dit wijst er dus op, dat daar ook de kluwens gedeeltelijk renatureren. Vermoedelijk heerst er in de betrekkelijk kleine kluwens bij het begin van de denaturering minder wanorde dan in de grotere die bij het voortschrijden van het smeltproces ontstaan, waardoor de renaturering gemakkelijker verloopt.

Als de temperatuur van de DNA oplossing na renaturering nogmaals in een sprong met dezelfde waarde wordt verhoogd, zal de ex-

inctie vrijwel uitsluitend stijgen door het opnieuw uitzetten van de helices. Dit betekent, dat de tweede extinctieverhoging geheel renatureerbaar zal zijn. Dit is in overeenstemming met de waarneming dat

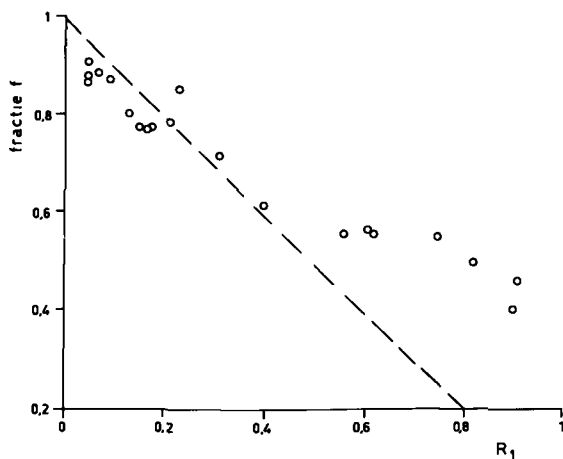


Fig. 5.1 Het verband tussen de renatureringsindex R_1 en de fractie (f) van de extinctietoename, die een gevolg is van het langzame proces. De figuur is samengesteld met behulp van de figuren 3.7 en 3.8. T4-DNA in HMPEP, gemiddeld 0,6 enkelstrengbreuken per molecuul. De gebroken lijn geeft het verband $R = 1 - f$ aan.

voor het gehele smeltgebied geldt dat $R_2 = 1$. Voorts zal de relaxatie na de tweede sprong volgens een eerste-orde proces verlopen. Deze conclusie kon alleen in het eerste deel van de smeltcurve geverifieerd worden, omdat R_1 sterk afneemt met toenemende D_1 . In dit deel van de smeltcurve is R_1 niet gelijk aan $1 - f$, zodat hier nog een bijdrage van het langzame proces is te verwachten. Het bleek, dat voor de tweede sprong f aanzienlijk kleiner was dan voor de eerste en dat de relaxatietijd van het langzame proces ca. 150 sec kleiner was. Wellicht is de vermindering van de relaxatietijd toe te schrijven aan het denatureren van stukjes verkeerd gepaarde basen in de kluwens. De afstand waarover de windingen van deze stukjes in de kluwen moeten diffunderen, is waarschijnlijk klein, met het gevolg dat de relaxatietijd van dit proces relatief klein zal zijn.

5.5. Enkelstrengbreuken

Op grond van het in 4.4. en 4.5. ontwikkelde model wordt verwacht, dat enkelstrengbreuken een geringe invloed zullen uitoefenen op de grootte van de relaxatietijden. Fig. 3.10 laat zien dat de relaxatietijden inderdaad nagenoeg constant zijn tot grote waarden van p . Ook R_1 is vrijwel onafhankelijk van p . Deze waarnemingen stem-

men dus overeen met het model.

In tegenstelling tot de geringe invloed van p op de relaxatietijden heeft een verhoudingsgewijs klein aantal breuken al een grote invloed op f (fig. 3.11). Dit is een onverwacht resultaat dat niet zonder meer in het raam van het gegeven model kan worden verklaard. Er moet echter op worden gewezen, dat de conformatie van het gedeeltelijk gedenatureerde molekuul door het aanbrengen van enkelstrengbreuken ongetwijfeld verandert. Deze breuken zullen waarschijnlijk optreden als kernen van kluwengebieden, ook in gedeelten die anders nog in de stabiele helixconfiguratie zouden verkeren. De verdeling van helices en kluwens over het molekuul kan daardoor al door enkele breuken aanzienlijk worden gewijzigd ten opzichte van die in het intacte molekuul. Bovendien zullen de uiteinden van de gebroken strengen bij temperaturen in het smeltgebied los geraken, waardoor vanwege de verhoogde viskeuze weerstand voor grote aantallen breuken rotatie van het molekuul wordt bemoeilijkt.

5.6. Gebroken T4-DNA

Uit de in 3.4. vermelde resultaten blijkt, dat de relaxatietijden niet evenredig zijn met het kwadraat van het molekuulgewicht. In het licht van het onderhavige model is dit te begrijpen. De windingen behoeven namelijk niet helemaal naar het uiteinde van het molekuul te diffunderen maar slechts over een afstand ter lengte van een helix- of kluwenstuk. Pas als de gemiddelde afmeting van deze stukken vergelijkbaar wordt met de lengte van het gehele molekuul, zal er sprake zijn van een kwadratisch verband tussen de relaxatietijden en het molekuulgewicht. Het is moeilijk aan te geven bij welk molekuulgewicht dit merkbaar wordt, omdat naarmate de molekulen kleiner zijn, de in het huidige model verwaarloosde eindeffecten een grotere rol gaan spelen. Bovendien zal bij kleine molekulen het surplus aan windingen gemakkelijker door rotatie kunnen worden verwijderd. Dit heeft tot gevolg dat de eindconcentratie van windingen in de kluwen lager is, waardoor de lange relaxatietijd kleiner zal zijn. Dit zou kunnen verklaren dat τ_2 voor T4-DNA dat is afgebroken tot stukken van 18 MD, ongeveer 150 sec kleiner is dan voor ongebroken T4-DNA, terwijl τ_1 voor beide materialen ongeveer even groot is.

Indien er een grens bestaat waaronder de relaxatietijden evenredig zijn met het kwadraat van het molekuulgewicht, zal deze lager liggen dan ongeveer 20 MD (zie 3.4.). Dit komt overeen met de experimenten van Crothers (16). De fractie f is voor gebroken T4-DNA aanzienlijk kleiner dan voor het intacte materiaal. Dit resultaat heeft enige overeenkomst met het kleiner worden van f bij een toenemend aantal enkelstrengbreuken. Vermoedelijk spelen hier dezelfde effecten een rol. Door de schuifspanningen worden in het DNA op betrekkelijk willekeurige plaatsen dubbelstrengbreuken aangebracht, zoals blijkt uit de brede molekuulgewichtsverdeling die ontstaat bij lage waarden

van de schuifspanningen. Bovendien is T4-DNA cyclisch gepermuteerd (39), zodat, ook al zouden de molekulen precies in het midden worden gebroken, de breuk niet in elk molecuul op dezelfde plaats wordt aangebracht. De uiteinden van de brokstukken DNA zijn gebieden met een geringe stabiliteit en zullen bij verhoogde temperaturen in een vroeg stadium ontwinden. Hierdoor zal dus, evenals bij de aanwezigheid van enkelstrengbreuken, de verdeling van de helices en de kluwens over de brokstukken van een molecuul verschillen van de verdeling in het ongebroken molecuul. Het effect hiervan op de relaxatieparameters f en R_1 is niet te voorspellen.

5.7. T7-DNA

De basensamenstelling van DNA heeft, zoals uit de proeven met T7-DNA blijkt, een uitgesproken effect op de relaxatie. De relaxatietijden zijn voor T7-DNA aanzienlijk kleiner dan die voor T4-DNA met eenzelfde molekuulgewicht. De interactie tussen de basenparen in de helices zal in T7-DNA gemiddeld groter zijn dan in T4-DNA vanwege het hogere G + C gehalte van T7-DNA. De diffusiecoëfficiënt D_h zal daardoor voor T7-DNA groter zijn, met als gevolg dat de waarde van τ_1 voor T7-DNA kleiner is dan die voor T4-DNA. Dit komt met de waarnemingen overeen (fig. 3.5).

De lage waarde van τ_2 voor T7-DNA moet gedeeltelijk worden toegeschreven aan het kleine molekuulgewicht van dit DNA. Het betrekkelijk grote verschil tussen de waarde van τ_2 voor T7-DNA en die voor gebroken T4-DNA van ongeveer hetzelfde molekuulgewicht zou erop kunnen duiden, dat de kluwens in T7-DNA gemiddeld kleinere afmetingen hebben dan die in T4-DNA.

De fractie f van T7-DNA komt voor $D_1 < 0,6$ ongeveer overeen met die van ongebroken T4-DNA, evenals de renatureerbare fractie R_1 . Voor grotere D_1 bereikt $f(T7)$ binnen de meetnauwkeurigheid de waarde 1 (fig. 3.7); er zou dus bij grote D_1 geen bijdrage meer zijn van de snelle component. De nauwkeurigheid waarmee f kan worden bepaald is echter niet groter dan ca. 10%, zodat de verschillen tussen $f(T7)$ en $f(T4)$ niet significant behoeven te zijn.

Het verband tussen R_1 en D_2 voor ongebroken T4-DNA verschilt significant van dat voor T7-DNA. Trekt men namelijk volgens de methode der kleinste kwadraten de beste hogeregraadskromme door alle punten tezamen, dan liggen er significant meer T7 punten boven de kromme dan eronder en meer T4 punten eronder dan erboven. Deze conclusie heeft een betrouwbaarheid van 99,6% volgens de 2×2 -tabellen test. De curven in fig. 3.8 zijn tweedegraadskrommen, getrokken volgens de methode der kleinste kwadraten. De grotere geneigdheid van T7-DNA te renatureren bij een kleine temperatuurdaling zou, evenals het verschil in τ_2 tussen T7- en T4-DNA, verklaard kunnen worden door geringere afmetingen van de kluwens in T7-DNA, waardoor er minder kans is op foutieve basenparing.

5.8. Conclusies

Het in hoofdstuk 4 ontwikkelde model voor de denaturering van DNA werd gebaseerd op experimentele aanwijzingen, dat de structuur van de dubbele helix in oplossing afhangt van de uitwendige omstandigheden. Als karakteristieke parameter voor de helix-kluwenovergang werd het aantal windingen per eenheid van lengte gebruikt, waarbij werd verondersteld, dat veranderingen in de "windingsdichtheid" plaatsvinden volgens een diffusieproces. Er zij op gewezen dat dit een min of meer formele benadering is, die in zijn meest algemene vorm van toepassing is op alle quasistatische processen waarbij parameters in het spel zijn, die afhankelijk zijn van zowel de tijd als van de plaats.

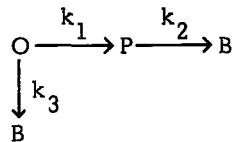
In dit hoofdstuk werden enige eigenschappen van het nieuwe model voor de relaxatie van DNA getoetst aan de experimentele resultaten. Er werd een redelijke overeenstemming geconstateerd. In zoverre was de in dit proefschrift voorgestelde benadering van de relaxatie succesvol. Daar staat tegenover dat de waarde van de relaxatietijd niet met behulp van de theorie kon worden voorspeld. Evenmin was het mogelijk uit de experimenten een waarde voor de diffusiecoëfficiënten af te leiden, omdat de uitgebreidheid van de helices en van de kluwens en de verdeling van deze gebieden over het molekuul niet bekend is. Pas als deze verdeling voor een bepaalde plaats in de smeltcurve kan worden vastgesteld, kan de theorie tot kwantitatieve uitspraken komen.

Het is verder niet mogelijk uit de experimentele resultaten een waarde te bepalen voor de belangrijke parameter c , die aangeeft hoe sterk het hypochrome effect van veranderingen in de helixstructuur afhangt, omdat de hiervoor benodigde kennis van de begin- en eindwaarde van de windingsdichtheid ontbreekt. In het algemeen blijkt het model te veel parameters te bevatten om met behulp van relaxatie-experimenten alléén kwantitatieve uitspraken te doen omtrent de waarde van deze parameters. Gezien de complexe samenstelling van natuurlijk DNA is dit niet verwonderlijk. Het zou daarom nuttig zijn de experimenten te verrichten met kunstmatige DNA's, bestaande uit slechts één soort basenparen. Het is echter tot nu toe niet gelukt synthetische polynucleotiden te bereiden zonder vertakkingen (118, 119). Deze vertakkingen zullen het relaxatieproces aanzienlijk compliceren. Wellicht kan de in de krab Cancer Borealis gevonden DNA component, die vrijwel geheel uit AT paren bestaat (120), uitkomst bieden.

APPENDIX A

EEN MECHANISME VOOR HET ONTSTAAN VAN BREUKEN IN DNA DOOR VERWARMING

Stel N het aantal nucleotiden per streng, O het aantal ongebroken fosforesterbindingen per streng, P het aantal fosforesterbindingen per streng naast een gedepurineerde plaats en B het aantal breuken per streng. Gemiddeld over de twee strengen van een DNA molekuul is het aantal purines per streng $N/2$. Stel voorts de reactieconstante voor depurineren k_1 , die voor het breken van een fosforesterbinding naast een gedepurineerde plaats k_2 en die voor het breken van een willekeurige fosforesterbinding k_3 . Het reactieschema voor het ontstaan van breuken langs directe weg en langs indirecte weg via depurineren wordt dan als volgt weergegeven:



k_1 en k_3 zijn beide van de orde van 10^{-8} sec^{-1} (zie paragraaf 2.7.1.). Dit is zo klein, dat in het beschouwde tijdsverloop het totale aantal ongebroken fosfordiesterbindingen niet noemenswaardig afneemt. O is dus bij benadering constant en gelijk aan $2N$ (voor T4-DNA is N ongeveer gelijk aan 2×10^5). De differentiaalvergelijkingen die voor de reactie gelden, zijn dan:

$$\frac{dP}{dt} = +2 \cdot k_1 \cdot \frac{N}{2} - k_2 \cdot P$$

$$B = P = 0 \quad \text{voor} \quad t = 0$$

$$\frac{dB}{dt} = +k_2 \cdot P + k_3 \cdot 2N$$

De oplossing van dit stelsel luidt:

$$B = \frac{k_1}{k_2} \cdot N \cdot \left[\exp(-k_2 t) - 1 \right] + N(k_1 + 2k_3) t \quad (\text{A1})$$

Voor grote t nadert (A1) tot

$$B = -\frac{k_1}{k_2} N + N(k_1 + 2k_3)t \quad t \gg 0 \quad (A2)$$

De grafiek van B tegen t vormt voor $t \gg 0$ een rechte lijn met helling $N(k_1 + 2k_3)$, die bij extrapolatie naar $t = 0$ de B -as snijdt in $-\frac{k_1}{k_2} N$. Voor kleine t geldt in eerste-orde benadering $B = 2Nk_3 t$.

De grafiek van B tegen t vormt dus een door de oorsprong gaande rechte lijn met helling $2Nk_3$, die overgaat in een tweede rechte lijn met helling $N(k_1 + 2k_3)$. Door deze hellingen en het stuk $\frac{k_1}{k_2} N$ uit de experimentele curve B versus t te meten kunnen de reactieconstanten k_1 , k_2 en k_3 worden bepaald.

APPENDIX B

DE GEMIDDELDE RELAXATIETIJD VAN EEN OPLOSSING VAN DNA WAARIN LUKRAAK BREUKEN ZIJN AANGEBRACHT VOOR HET GEVAL DAT τ EVENREDIG IS MET M^2

Beschouw een oplossing van polydispers DNA. Zij n_i het aantal per liter van de molekulen met massa m_i . Is de extinctie van een oplossing van 1 gram DNA per liter ϵ_i , dan is de totale extinctie van de DNA oplossing

$$E = \sum_i n_i m_i \epsilon_i \quad (B1)$$

Indien na een sprongsgewijze temperatuurverhoging de extinctie van elke fractie een exponentiële functie van de tijd is, gekarakteriseerd door een relaxatietijd τ_i , geldt

$$\epsilon_i(\infty) - \epsilon_i(t) = \left\{ \epsilon_i(\infty) - \epsilon_i(0) \right\} \exp(-t/\tau_i) \quad (B2)$$

Vermenigvuldigen met $n_i m_i$ en sommeren over i geeft

$$\begin{aligned} \sum_i n_i m_i \epsilon_i(\infty) - \sum_i n_i m_i \epsilon_i(t) &= \sum_i n_i m_i \epsilon_i(\infty) \exp(-t/\tau_i) + \\ &\quad - \sum_i n_i m_i \epsilon_i(0) \exp(-t/\tau_i) \end{aligned} \quad (B3)$$

Er wordt verondersteld dat $\epsilon_i(\infty)$ en $\epsilon_i(0)$ onafhankelijk zijn van het molekuulgewicht. Dit is gerechtvaardigd, want voor molekuulgewichten groter dan enkele honderdduizenden is de vorm van de smeltcurve onafhankelijk van het molekuulgewicht. Uit (B3) volgt dan

$$E(\infty) - E(t) = \left\{ E(\infty) - E(0) \right\} F(t)$$

waarin

$$F(t) = \sum_i c_i \exp(-t/\tau_i) \quad (B4)$$

met

$$c_i = \frac{n_i m_i}{\sum_i n_i m_i}, \quad \sum_i c_i = 1 \quad (B5)$$

Ter vereenvoudiging wordt nu aangenomen dat de relaxatie kan

worden benaderd door één e-macht indien in de exponent hiervan de gemiddelde relaxatietijd $\bar{\tau}$ voorkomt. De functie $F(t)$ wordt dus vervangen door de functie $F'(t) = \exp(-t/\bar{\tau})$. Deze benadering is alleen bruikbaar indien de beginhelling van de werkelijke en van de benaderde relaxatiecurve gelijk is, dus als geldt

$$\left(\frac{dF'}{dt}\right)_{t=0} = \left(\frac{dF}{dt}\right)_{t=0} \quad (B6)$$

Hieruit volgt voor de gemiddelde relaxatietijd

$$\frac{1}{\bar{\tau}} = -\left(\frac{dF}{dt}\right)_{t=0} = \sum_1 c_1 / \tau_1 \quad (B7)$$

De gemiddelde relaxatietijd zal nu worden berekend als functie van het gemiddelde aantal enkelstrengbreuken per molecuul in een oplossing van monodispers DNA, voor het geval dat τ evenredig is met M^2 . Indien enkelstrengbreuken dezelfde invloed hebben als dubbelstrengbreuken, zal de relaxatietijd van een stuk van het molecuul gelegen tussen twee enkelstrengbreuken evenredig zijn met het kwadraat van de lengte, dus met het kwadraat van het molekulgewicht van zo'n stuk.

Uitgaande van een molekulgewicht M voor het ongebroken molecuul, geldt bij lukrake breuk voor de gewichtsfractie enkelstrengstukken, waarvan het molekulgewicht ligt tussen m en $m + dm$ (18):

$$n(m) dm = \frac{pm}{M^2} \exp(-p \frac{m}{M}) \cdot (2 + (1 - \frac{m}{M}) p) dm \quad (B8)$$

waarin p het gemiddelde aantal enkelstrengbreuken per molecuul is. Indien geldt dat $\tau_1 = k \cdot m^2$, volgt uit (B7) en (B8)

$$\frac{1}{\bar{\tau}} = \frac{1}{k} \int_0^M \frac{n(m) dm}{m^2} + \frac{\exp(-p)}{kM^2} \quad (B9)$$

waarin de laatste term de reciproke relaxatietijd van de fractie ongebroken materiaal voorstelt.

Bij een willekeurige verdeling van het aantal enkelstrengbreuken over het molecuul komen er ook zeer korte stukjes tussen twee breuken voor. Hoewel de kans dat dit gebeurt zeer klein is als p een kleine fractie is van het totale aantal bindingen die kunnen breken, nadert de door (B9) gedefinieerde gemiddelde relaxatietijd hierdoor toch tot nul, d.w.z. wordt de helling van de relaxatiecurve voor $t = 0$ oneindig. In de praktijk echter is het niet mogelijk extinctieverschillen ten gevolge van gewichtsfracties kleiner dan 1% te meten. Daarom wordt de ondergrens van de integraal in (B9) vervangen door a , waarbij a zo wordt gekozen dat de som van alle gewichtsfracties met molekulge-

wicht kleiner dan a gelijk is aan 1%. a wordt dus gevonden uit

$$0,01 = \int_0^a n(m) dm \quad (B10)$$

(B9) gaat nu over in

$$\frac{1}{\tau} = \frac{p}{kM^2} (2 + p) \int_b^p \frac{\exp(-x)}{x} dx + \frac{p+1}{kM^2} \exp(-p) - \frac{p}{kM^2} \quad (B11)$$

waarin $b = \frac{ap}{M}$. Voor p groter dan 10 heeft b ongeveer de waarde 0,15; voor p = 1 is b = 0,08. Na integratie levert (B11)

$$\frac{1}{\tau} = \frac{p}{kM^2} p(p+2) (-Ei(-b) + Ei(-p)) + \frac{p+1}{kM^2} \exp(-p) - \frac{p}{kM^2} \quad (B12)$$

waarin Ei (-x) de Eulerintegraal is. Voor x = 0,08 is $-Ei(-x) = 2,03$; voor x = 0,15 is $-Ei(-x) = 1,46$. Voor x > 1 neemt $-Ei(-x)$ zeer snel af tot nul, waardoor (B12) voor p > 10 geschreven kan worden als

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1,46}{kM^2} p(p+2) - \frac{p}{kM^2} = \frac{p}{kM^2} (1,46 p + 1,92) \quad (B13)$$

De onderstelling $\tau_1 = k.m_1^2$ leidt dus tot een gemiddelde relaxatietijd die voor grote waarden van p bij benadering afneemt met het kwadraat van p.

SUMMARY

By raising the temperature or the pH of a solution of double-stranded DNA an equilibrium state can be established in which the molecules are only partly denatured. If under such conditions a small stepwise change of temperature or pH is applied the extinction of the solution at 260 nm does not change immediately but approaches its final value only after several minutes. In the present thesis this relaxation phenomenon has been studied for DNA solutions that were subjected to small upward temperature jumps. Furthermore the influence of single- and double-strand breaks has been examined. The DNA was obtained by isolation from the bacteriophages T4 and T7.

The temperature of a buffer solution of pH 7, containing 0.01 M phosphate, 1 mM EDTA, 1 mM pyrophosphate and approximately 40 μ g/ml DNA, was raised rapidly by heating the solution directly in a 1 cm spectrophotometer cell by means of a platinum heating element. The temperature was measured with a Cu-constantan thermocouple with a relative accuracy of 0.01°C. The thermovoltage was compared with a very stable voltage source and the difference, after amplification, was fed into a power amplifier, producing a dc heating current proportional to this difference. In this way the contents of the cell reached the final temperature in 1.5 sec without overshoot (Fig. 2.1 and Fig. 2.2). The temperature before and after the jump could be kept constant within 0.02°C.

The influence of any effects of heat, shear or electrolysis that could occur during a relaxation experiment and could affect the integrity of the DNA was examined in control experiments. Heating of DNA at 60° in 0.01 M phosphate buffer pH 7 induces approximately 1.7 single-strand breaks per hour during the first three hours. For longer times this rate increases with time (Fig. 2.3). This was attributed to depurination and subsequent breaking of the DNA strands (par. 2.7.1. and Appendix A). Shear effects due to stirring proved to be negligible but the dc heating system appeared to cause some single-strand breakage, presumably due to electrolytic effects. Pyrophosphate was found to reduce this damage to negligible proportions.

For both T4- and T7-DNA the relaxation of the extinction after a temperature jump of 0.7° within the melting range could be described by the sum of two exponentials (Fig. 3.4), i.e.

$$E(\infty) - E(t) = A \exp(-t/\tau_1) + B \exp(-t/\tau_2)$$

The relaxation times τ_1 and τ_2 and the fraction $f = B/(A+B)$ depend on the extent of denaturation D_1 , defined as the ratio of the hyper-

chromicity at the initial temperature of the jump to full hyperchromicity after complete denaturation (Fig. 3.5, 3.6 and 3.7).

For T4-DNA with a mean number of single-strand breaks per molecule of 0.6, τ_1 decreases gradually from about 55 to about 35 sec when D_1 increases from 0.03 to 0.7, whereas τ_2 has a constant value of about 450 sec up to $D_1 = 0.4$ and then drops rather abruptly as D_1 increases further. The fraction f increases approximately linearly with increasing D_1 .

Similar experiments were performed with sheared T4-DNA with a weight-average molecular weight M of 18×10^6 and with T7-DNA ($M = 27 \times 10^6$). The fast relaxation time of the sheared T4-DNA is comparable in magnitude to that of unbroken T4-DNA, but the longer relaxation time is markedly reduced from 450 to about 300 sec. The fraction f is lower than that of unbroken DNA. For T7-DNA τ_1 shows a small increase from 20 to 30 sec as D_1 increases from 0.1 to 0.6. τ_2 decreases abruptly from 150 to 90 sec between $D_1 = 0.1$ and $D_1 = 0.4$, and then remains constant as D_1 increases further. The dependence of f on D_1 does not differ appreciably from that of unbroken T4-DNA. From these experiments it is concluded that base composition affects the relaxation significantly.

In order to check the hypothesis that single-strand breaks enhance the rate of the relaxation (16), a number of experiments were performed with T4-DNA in which single-strand breaks had been induced deliberately either by prolonged heat treatment at 60° or, for more than 15 single-strand breaks per molecule by irradiation with ^{60}Co gamma rays. It was found that both relaxation times are nearly independent of the number of single-strand breaks (Fig. 3.10). However, the fraction f decreases sharply as the number of breaks increases from 0 to 20 and then levels off for larger numbers (Fig. 3.11). Apparently the contribution of the fast process is enhanced by single-strand breaks.

In a number of experiments a DNA solution that had reached equilibrium after a temperature jump, was cooled again to the initial temperature of the jump. The resulting decrease in extinction due to renaturation of the DNA was in general not equal to the change in extinction after the upward temperature jump. Apparently under the experimental conditions the DNA is not able to renature completely, although a large part of the molecule is still in register. The renaturable fraction R_1 of the increase in extinction due to the temperature jump decreases as D_2 increases (Fig. 3.8) and is independent of single-strand breaks (Fig. 3.12).

The experimental results cannot be explained by the existing theory on the relaxation of DNA (16), because according to this theory the relaxation times should be proportional to the square of the molecular weight and inversely proportional to the square of the number of single-strand breaks per molecule. The fraction f should be independent of D_1 and the relaxation times should show a maximum at $D_1 = 0.5$, contrary to what was found in the present experiments.

In chapter 4 a new phenomenological model is developed, in which it is assumed that the increase of extinction after a temperature jump is not solely due to unpairing of the bases in DNA but also to a decrease of the interaction of neighbouring bases in helical parts of the molecule. The extent of the hyperchromic effect in a helical section in the molecule can then be expressed as a function of the number of windings per unit length (W), this number being dependent on the orientations and distances between the base pairs. A perturbation of an external parameter is assumed to cause a small decrease of W in the helical sections, while at the same time a certain number of windings at the ends of the helical sections diffuse into the adjacent coil region. Both processes are supposed to contribute significantly to the hyperchromic rise of the extinction and to be governed by a diffusion equation in which W is the diffusing quantity. The mathematical treatment shows that to a first-order approximation the relaxation can be described by the sum of two exponentials. This model leads to a qualitative description of the relaxation process consistent with the experiments, provided that the diffusion coefficient in the helical sections is assumed to be much larger than that in the coil regions.

LITERATUUR

1. Avery, O.T., MacLeod, C.M. en McCarty, M. (1944). J.Exp.Med. 79, 137
2. Wilkins, M.H.F., Stokes, A. en Wilson, H.R. (1953). Nature 171, 740
3. Watson, J.D. en Crick, F.H.C. (1953). Nature 171, 737
4. Watson, J.D. en Crick, F.H.C. (1953). Nature 171, 964
5. Chargaff, E., Zamenhof, S., Brawerman, G. en Kerin, L. (1950). J.Amer.Chem.Soc. 72, 3825
6. Langridge, R., Wilson, H.R., Hooper, C.W., Wilkins, M.H.F. en Hamilton, L.O. (1960). J.Mol.Biol. 2, 19
7. Meselson, M. en Stahl, F.W. (1958). Proc.Natl.Acad.Sci., U.S., 44, 671
8. Hershey, A.D. (1953). J.Gen.Physiol., 37, 1
9. Marmur, J. en Doty, P. (1959). Nature 183, 1427
10. Studier, F.W. (1965). J.Mol.Biol. 11, 273
11. Kuhn, W. (1957). Experientia 13, 301
12. Levinthal, C. en Crane, H.R. (1956). Proc.Natl.Acad.Sci., U.S., 42, 436
13. Longuet-Higgins, H.C. en Zimm, B.H. (1960). J.Mol.Biol. 2, 1
14. Fixman, M. (1963). J.Mol.Biol. 6, 39
15. Fong, P. (1964). Proc.Natl.Acad.Sci., U.S., 52, 239
16. Crothers, D.M. (1964). J.Mol.Biol. 9, 712
17. Freifelder, D. (1967). Biochem.Biophys.Res.Comm. 29, 856
18. Van der Schans, G.P., Aten, J.B.T., Knijnenburg, C.M. en Meyer, J. (1968). Rapport Medisch Biologisch Laboratorium, 68-2
19. Spatz, H.C. en Baldwin, R.L. (1965). J.Mol.Biol. 11, 213
20. Eigen, M. en de Maeyer, L. (1963). Techniques of Organic Chemistry, ed. S.L. Friess, E.S. Lewis en A. Weissberger no.8, deel II, p. 969. 2^{de} ed., Interscience Publishers, New York
21. Takashima, S. en Arnolds, E.A. (1965). Biochim.Biophys.Acta 94, 546
22. Peacock, A.R. en Walker, I.O. (1962). J.Mol.Biol. 5, 550, 560
23. Freese, E.B. en Freese, E. (1963). Biochemistry 2, 707
24. Zimm, B.H. en Rice, S.A. (1960). Molecular Physics 3, 391
25. Record, M.T., Jr. (1967). Biopolymers 5, 993
26. Eigner, J. (1960). Dissertatie Harvard U.S.A.
27. Eigner, J., Boedtker, H. en Michaels, G. (1961). Biochim.Biophys.Acta 51, 165
28. Eigner, J. en Doty, P. (1965). J.Mol.Biol. 12, 549
29. Greer, S. en Zamenhof, S. (1962). J.Mol.Biol. 4, 123
30. Ginoza, W., et al. (1964). Nature 203, 606
31. Van der Schans, G.P. (1968). Persoonlijke mededeling

32. Aten, J.B.T. (1965). Dissertatie Leiden
33. Davison, P.F. en Freifelder, D. (1966). J.Mol.Biol. 16, 490
34. Pouwels, P.H. (1965). Dissertatie Leiden
35. Guthrie, G.D. en Sinsheimer, R.L. (1963). Biochim.Biophys.Acta 72, 290
36. Adams, M.H. (1959). Bacteriophages, p. 91. Interscience Publishers Inc. New York
37. Rubinstein, I., Thomas, C.A. en Hershey, A.D. (1961). Proc.Natl. Acad.Sci., U.S., 47, 1113
38. Lunt, M.R. en Newton, E.A. (1965). Biochem.J. 95, 717
39. Thomas, C.A. en Rubinstein, I. (1964). Biophys.J. 4, 93
40. Ritchie, D.A. et al. (1967). J.Mol.Biol. 23, 365
41. Veldhuizen, G. (1966). Dissertatie Leiden
42. Lunan, K.O. en Sinsheimer, R.L. (1956). Virology 2, 455
43. Mandell, J.D. en Hershey, A.D. (1960). Anal.Biochem. 1, 66
44. Marmur, J. en Doty, P. (1962). J.Mol.Biol. 5, 109
45. Davison, P.F. (1960). Proc.Natl.Acad.Sci., U.S., 45, 1560
46. Fiers, W. en Sinsheimer, R.L. (1962). J.Mol.Biol. 5, 420
47. Flory, P.J. (1953). Principles of Polymer Chemistry, Cornell University Press, Ithaca, New York, p. 325
48. Bohaček, J. en Blažiček, G. (1965). Biophysik 2, 233
49. Morgan, R.S. (1958). Disc.Faraday Soc. 25, 193
50. Mason, E.A. en Kreevoy, M.M. (1955). J.Amer.Chem.Soc. 77, 5808
51. Gordon, D.E., Curnutte, B., Jr. en Lark, K.G. (1965). J. Mol. Biol. 13, 571
52. Lubas, B., Wilczok, T. (1966). Biochim.Biophys.Acta 120, 427
53. Ames, B.N. en Dubin, D.T. (1960). J.Biol.Chem. 235, 769
54. Tabor, H. en Tabor, C.W. (1964). Pharmacol.Rev. 16, 254
55. Shepherd, G.R. en Hopkins, P.A. (1963). Biochem.Biophys.Res. Comm. 10, 103
56. Liquori, A.M. et al. (1967). J.Mol.Biol. 24, 113
57. Hill, T.L. (1957). J.Polymer Sci. 23, 549
58. Gibbs, J.H. en DiMarzio, E.A. (1959). J.Chem.Phys. 30, 271
59. Zimm, B.H. en Bragg, J.K. (1959). J.Chem.Phys. 31, 526
60. Zimm, B.H. (1960). J.Chem.Phys. 33, 1349
61. Applequist, J. en Damle, V. (1963). J.Chem.Phys. 39, 2719
62. Lifson, S. en Zimm, B.H. (1963). Biopolymers 1, 15
63. Lifson, S. (1963). Biopolymers 1, 25
64. Lifson, S. en Allegra, G. (1964). Biopolymers 2, 65
65. Litan, A. (1964). Biopolymers 2, 279
66. Litan, A. en Lifson, S. (1965). J.Chem.Phys. 42, 2528
67. Crothers, D.M. en Kallenbach, N.R. (1965). J.Mol.Biol. 11, 802
68. Crothers, D.M. en Kallenbach, N.R. (1966). J.Chem.Phys. 45, 917
69. Crothers, D.M. (1966). Biopolymers 4, 1025
70. Montroll, E.W. en Goel, N.S. (1966). Biopolymers 4, 855
71. Reiss, H., McQuarrie, D.A., McTague, J.B. en Cohen, E.R. (1966). J.Chem.Phys. 44, 4567
72. Flory, P.J. en Miller, W.G. (1966). J.Mol.Biol. 15, 284

73. Poland, D. en Scheraga, H.A. (1966). J.Chem.Phys. 45, 1464
74. Poland, D., Vournakis, J.N. en Scheraga, H.A. (1966). Biopolymers 4, 223
75. Vournakis, J.N., Poland, D. en Scheraga, H.A. (1967). Biopolymers 5, 403
76. Bixon, M. en Lifson, S. (1967). Biopolymers 5, 509
77. Strässler, S. (1967). J.Chem.Phys. 46, 1037
78. Hijmans, J. (1967). J.Chem.Phys. 47, 5116
79. Applequist, J. (1967). Conformation of Biopolymers, ed. G.N. Ramachandran, Acad.Press, New York, p. 403
80. Ising, E. (1925). Z.Physik 31, 253
81. Newell, G.F. en Montroll, E.W. (1953). Rev.Mod.Phys. 25, 353
82. Schwarz, G. (1968). Biopolymers 6, 873
83. Birshtein, T.M. en Ptitsyn, O.B. (1966). Conformations of Macromolecules, Interscience Publishers, New York
84. Go, N. (1967). J.Phys.Soc.Japan 22, 416
85. Schwarz, G. (1965). J.Mol.Biol. 11, 64
86. Schwarz, G. (1968). Rev.Mod.Phys. 40, 206
87. Goel, N.S. (1968). Biopolymers 6, 55
88. Craig, M.E. en Crothers, D.M. (1968). Biopolymers 6, 385
89. Tinoco, I., Jr. (1960). J.Chem.Phys. 33, 1332; 34, 1067
90. Rhodes, W. (1961). J.Amer.Chem.Soc. 83, 3609
91. DeVoe, H. en Tinoco, I., Jr. (1962). J.Mol.Biol. 4, 518
92. Tinoco, I., Jr. (1960). J.Amer.Chem.Soc. 82, 4785
93. Bradley, D.F., Lifson, S. en Honig, B. (1964). Electronic Aspects of Biochemistry, ed. B. Pullman, Acad.Press, New York, p.77
94. Claverie, P. (1968). J.Chim.Phys. 65, 57
95. Rhodes, W. en Barnes, D.G. (1968). J.Chim.Phys. 65, 78
96. Rich, A. en Tinoco, I., Jr. (1960). J.Amer.Chem.Soc. 82, 6409
97. Applequist, J. (1961). J.Amer.Chem.Soc. 83, 3158
98. Tinoco, I., Jr., Woody, R.W. en Bradley, D.F. (1963). J.Chem.Phys. 38, 1317
99. Davies, R.C. en Tinoco, I., Jr. (1968). Biopolymers 6, 223
100. Lin, H.J. en Chargaff, E. (1967). Biochim.Biophys.Acta 145, 398
101. Blok, Joh., Luthjens, L.H. en Roos, A.L.M. (1964). Rapport Medisch Biologisch Laboratorium 64-17
102. Sinsheimer, R.L. (1959). J.Mol.Biol. 1, 43
103. Wang, J.C., J.Mol.Biol. Ter perse
104. Lang, D. et al. (1967). J.Mol.Biol. 23, 163
105. Felsenfeld, G. en Hirschman, S.Z. (1965). J.Mol.Biol. 13, 407
106. Beer, M. en Thomas, C.A., Jr. (1961). J.Mol.Biol. 3, 699
107. Bartl, P. en Boubik, M. (1965). Biochim.Biophys.Acta 103, 678
108. Inman, R.B. (1966). J.Mol.Biol. 18, 464
109. Kleinschmidt, A. et al. (1962). Biochim.Biophys.Acta 61, 857
110. Beers, W., Cerami, A. en Reich, E. (1967). Proc.Natl.Acad.Sci., U.S., 58, 1624
111. Pouwels, P.H. en Jansz, H.S. (1964). Biochim.Biophys.Acta 91, 177

112. Pouwels, P.H. (1968). Persoonlijke mededeling
113. Pouwels, P.H., Knijnenburg, C.M., Van Rotterdam, J., Cohen, J.A. en Jansz, H.S. (1968). *J.Mol.Biol.* 32, 169
114. Crothers, D.M. en Zimm, B.H. (1964). *J.Mol.Biol.* 9, 1
115. Carslaw, H.S. en Jaeger, J.C. (1959). *Conduction of Heat in Solids*, 2nd ed., p. 282, Oxford: Clarendon Press
116. Crank, J. (1956). *Mathematics of Diffusion*, pp. 45, 58. Oxford: Clarendon Press
117. Marmur, J., Rownd, R. and Schildkraut, C.L. (1963). *Progress in Nucleic Acid Research*, Vol. 1, p. 231, ed. Davidson, J.N. and Cohn, W.E., Acad.Press, New York
118. Michelson, A.M., Massoulié, J. en Guschlbauer, W. (1967). *Progress in Nucleic Acid Research*, Vol. 6, p. 83, ed. Davidson, J.N. and Cohn, W.E., Acad.Press, New York
119. Smellie, R.M.S. (1965). *British Med.Bull.* 21, 195
120. Sueoka, N. (1961). *J.Mol.Biol.* 3, 31
121. Sueoka, N. (1967). *Molecular Genetics*, part II, p. 1, ed. Taylor, J.H., Acad.Press, New York