Die Fraktionen (ca. 15 ml pro 30 min) werden auf ihren Uronsäuregehalt getestet. Die einzelnen Fraktionen werden zusammengefaßt, gegen dest. Wasser chloridfrei dialysiert, gefriergetrocknet und ausgewogen. Die Aussagen über die Mucopolysaccharid-Peptide werden an Hand des Aminosuckerspektrums (Aminosäure-Analysator) erhalten.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. HAUSS und seinen Mit-

arbeitern, Med. Klinik der Univ. Münster, durchgeführt, denen wir für die Bereitstellung des Aortenmaterials und für eingehende Diskussionen danken. — Herrn Prof. Dr. MICHEEL sei für die Erlaubnis zur Benutzung des Aminosäuren-Analysators (Leihgabe des Landesamtes für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen) gedankt. — Dem Landesamt für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen und dem Verband der Chemischen Industrie „Fonds der Chemie“ sind wir für die materielle Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Zur Metachromasie von Toluidinblau in Gegenwart von Nucleinsäuren

K. TEMPEL

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. K. ZIPF)

(Z. Naturforschg. **24 b**, 1279—1283 [1969]; eingegangen am 23. April 1969)

1. Nach Zusatz von Nucleinsäuren zu wäßrigen Toluidinblaulösungen treten neue Farbqualitäten auf. Ihre Absorptionsmaxima lagen bei 655, 585 und 555 nm.
2. Art und Umfang dieser Metachromasie sind abhängig vom Reaktionsmilieu, vom Farbstoff-Polyanionen-Konzentrationsverhältnis sowie von Molekülgröße und Nativität der einzelnen Nucleinsäurepräparate.
3. In wäßrigen Proteinlösungen gelöste hochmolekulare DNS-Präparate verhalten sich gegenüber DNS-Lösungen ohne Proteinzusatz wie Präparate höherer Nativität.
4. Änderungen der metachromotropen Eigenschaften von DNS-Protein-Lösungen sind qualitativ und quantitativ als empfindlicher Nachweis für denaturierende Einflüsse (Hitze, ionisierende Strahlen, UV-Licht, Ultraschall, Tris-(β -chloräthyl)-amin oder DNase I) verwertbar.

Das Wesen der Metachromasie besteht in der molekularen Wechselwirkung zwischen wäßrig gelösten kationischen Farbstoffen und anionischen Makromolekülen. Unter geeigneten Bedingungen kommt es zur genauen räumlichen Orientierung benachbarter Farbstoffmoleküle am Polyanion¹⁻⁵. Daraus folgt, daß die metachromatische Reaktion qualitativ und quantitativ gewisse Rückschlüsse auf Art, Menge und sterische Anordnung der für die Reaktion verfügbaren anionischen Gruppen zuläßt⁶. Inwieweit dies auch für Nucleinsäuren gilt, wurde vorliegend am Beispiel der Metachromasie von Toluidinblau (TB) in Gegenwart verschiedener Desoxyribonucleinsäure (DNS)- und Ribonucleinsäure (RNS)-Präparate untersucht. Zur *Denaturierung* der DNS-Präparate dienten Hitze, Röntgenstrahlen, UV-Licht, Ultraschall, Tris-(β -chloräthyl)-amin (Sinalost®) und Desoxyribonuclease I (EC 3.1.4.5.) (DNase I).

Material und Methoden

Material

1. Äthanol, 95-proz., mit Petroläther vergällt.
2. Albumin aus Hühnerei, Erg. B. 6, Riedel-DeHaen AG, Seelze.
3. Albumin aus Hühnerei, reinst, Serva, Nr. 11840.
4. Albumin aus Rindereserum, reinst, Serva, Nr. 11920.
5. Desoxyribonucleinsäure, Natriumsalz, aus Kalbsthymus, mind. 95% DNS, MG 8900000, N ca. 14,5%, P ca. 8,0%, EGA-Chemie Keppler und Reif, Steinheim am Albuch (*Präparat 1*).
6. Desoxyribonucleinsäure aus Kalbsthymus, lyophilisiert, reinst, hochmolekular, rel. Viskosität ca. 3,0, t_m mindestens 78 °C, nach Zamenhoff, Serva Nr. 18560 (*Präparat 2*).
7. Desoxyribonucleinsäure aus Lachssperma, lyophilisiert, reinst, hochpolymer, praktisch protein- und salzfrei, t_m ca. 78 °C, nach Emanuel und Chaikoff, Serva Nr. 18570 (*Präparat 3*).
8. R. CHAYEN and E. R. ROBERTS, Sci. J. Roy. Coll. Sci. **25**, 50 [1955].
9. M. D. SCHOENBERG and R. D. MOORE, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **83**, 42 [1964].
10. A. KRYGIER and K. KASPRZYK, Acta Med. Polona **2**, 123 [1961].

¹ M. ARNOLD, Histochemie **6**, 1 [1966].

² J.-P. BIDEGARAY et R. VIOVY, J. Chim. physique **61**, 1383 [1964].

³ J.-P. BIDEGARAY et R. VIOVY, J. Chim. physique **61**, 1391 [1964].

8. Desoxyribonucleinsäure, Natriumsalz, nach Hammarsten, MG ca. 1–2 Millionen, reinst, C. Roth, Karlsruhe (*Präparat 4*).
9. Desoxyribonucleinsäure aus Salm, eiweißfrei, N ca. 15,2%, P ca. 9,1–9,2%, Feuchtigkeit 5,1%, hochmolekular, rein, C. Roth, Karlsruhe (*Präparat 5*).
10. Desoxyribonucleinsäure, Natriumsalz aus Kalbs-thymus, nach Hammarsten, reinst, MG 1 200 000, Fluka AG, Nr. 89380 (*Präparat 6*).
11. Desoxyribonucleinsäure aus Heringssamen, Dr. Th. Schuchardt GmbH, München, Hauptkatalog Nr. DE 054 * (*Präparat 7*).
12. Desoxyribonucleinsäure, Natriumsalz, aus Herings-samen, Dr. Th. Schuchardt GmbH, München, Hauptkatalog Nr. DE 056 * (*Präparat 8*).
13. Desoxyribonuclease I (Desoxyribonucleat-oligo-nucleotidhydrolase, EC 3.1.4.5), lyophilisiert, rein, aus Rinderpankreas, 30 000 Dornase-Einheiten pro mg, Serva Nr. 18550.
14. Diphenylamin p. A., Merck Nr. 3086.
15. Essigsäure, 99–100% (D ca. 1,05) p. A., Merck Nr. 90063.
16. Folin-Ciocalteus Phenolreagens, Merck Nr. 9001.
17. β -Globulin aus Rinder Serum, lyophilisiert, rein, Serva Nr. 22490.
18. Kaliumacetat, reinst, Merck Nr. 4820.
19. Kaliumjodid p. A., Merck Nr. 5043.
20. Kupfersulfat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ p. A., Merck Nr. 2790.
21. Natriumcarbonat, wasserfrei p. A., Merck Nr. 6392.
22. Natronlauge, Titrisol®, 0,1-n., Merck Nr. 9959.
23. Ribonucleinsäure p. A., hochmolekular aus Hefe, $S_{20} \sim 8$, Serva Nr. 34404 (*Präparat 9*).
24. Ribonucleinsäure pract., niedermolekular aus Hefe, Serva Nr. 34410 (*Präparat 10*).
25. Ribonucleinsäure (Hefenucleinsäure), Trocken-substanz 94%, N $\geq 15,3\%$, P $\geq 8,7\%$, Biuretreaktion: Negativ, Dr. Th. Schuchardt GmbH, München, Hauptkatalog Nr. Nu 87 (*Präparat 11*)*.
26. Ribonucleinsäure, Natriumsalz, Trockensubstanz 94%, N $\geq 14,2\%$, P $\geq 8,4\%$, Biuretreaktion: Negativ, Dr. Th. Schuchardt GmbH, München, Hauptkatalog Nr. Nu 88 (*Präparat 12*)*.
27. Schwefelsäure, 95–97-proz. (D ca. 1,84) p. A., Merck Nr. 731.
28. Seignettesalz, K-Na-Tartrat p. A., Merck Nr. 8087.
29. Sinalost®, Tris-(β -chloräthyl)-amin·HCl (HN3)*, Nordmark-Werke.
30. Toluidinblau O (TB), Merck Nr. 1273.
31. Trichloressigsäure (TCE) z. A., Merck Nr. 807.

* Den Firmen sei an dieser Stelle für die großzügige Überlassung der Präparate gedankt.

⁷ W. C. SCHNEIDER, J. biol. Chemistry **161**, 293 [1945].

⁸ W. J. STEELE, N. OKAMURA, and H. BUSCH, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **87**, 490 [1964].

Methodik

Zur Entwicklung der TB-Metachromasie wurden 0,5 ml der wäßrigen Nucleinsäurelösungen mit 3 ml einer wäßrigen, 1,67 mg-proz. TB-Lösung versetzt. 15 min später wurde die Farbdichte der Proben in 1,0-cm-Glasküvetten mit dem Spektralphotometer PMQ II der Fa. C. Zeiss gemessen. Zur Bestimmung der DNS-Konzentration der Proben wurde die Methode von SCHNEIDER⁷ gering modifiziert: Die zur Fällung der DNS verwendete TCE-Endkonzentration betrug 4 Prozent. Die Präzipitate wurden zweimal mit einer 10-proz. äthanolischen Kaliumacetatlösung⁸ gewaschen.

Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden mit der Biuretmethode⁹ oder nach LOWRY et al.¹⁰ bestimmt.

Denaturierende Einflüsse

a) Hitze einwirkung

Wäßrige Nucleinsäurelösungen wurden 15 min im Wasserbad auf 90 °C erhitzt und unmittelbar anschließend mit Eiswasser auf 0 °C abgekühlt.

b) Röntgenstrahlen

Im allgemeinen wurden 1,56 bzw. 0,78 mg-proz. wäßrige DNS-Lösungen mit Oberflächendosen von 350 R pro min unter sorgfältiger Kühlung röntgenbestrahlt (Kristalloflex 4 der Fa. Siemens und Halske, 60 kV, 30 mA, HWS 0,16 mm Cu, Filterung 0,16 mm Cu, Abstand Focus – Objekt 10,0 cm).

c) UV-Licht

Zur UV-Bestrahlung der Nucleinsäurelösungen diente die Analysenlampe S 500 der Quarzlampen-Gesellschaft mbH, Hanau. Der Bestrahlungsabstand betrug 12,0 cm, die Schichtdicke der Nucleinsäurelösungen 0,5 cm. Die Proben wurden während der Bestrahlung gekühlt.

d) Ultraschall

Die Beschallung von Nucleinsäurelösungen wurde mit dem Branson-Sonifier, Modell S-125, HF-Generatur, Schallkopf mit Schallrüssel 1/2 durchgeführt. Im allgemeinen wurde – unter Kühlung – bei der höchsten mit diesem Gerät erreichbaren Energiestufe gearbeitet.

e) Sinalost®

Im allgemeinen wurden 1,56 mg-proz. DNS-Lösungen 24 Stdn. bei Zimmertemperatur in Gegenwart von HN3-Konzentrationen $\geq 2,48 \cdot 10^{-6}$ M inkubiert.

⁹ G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, T. BÜCHER, R. CZOK, K. J. GARBADE, E. MEYER-AHRENDT u. G. PFLEIDERER, Z. Naturforsch. **8b**, 555 [1957].

¹⁰ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry **193**, 265 [1951].

f) *DNase I*

Zur Überprüfung der metachromatischen Aktivität enzymatisch abgebauter DNS wurde letztere unter gleichzeitigem Proteinzusatz in wäßriger Lösung zusammen mit DNase I (in Endkonzentrationen von $50 - 0,005 \mu\text{g/ml}$) ohne sonstige Zusätze bei pH 6,0 und Zimertemperatur 30 min lang inkubiert.

Ergebnisse

Im sichtbaren Bereich hatte TB unter den gewählten Bedingungen ein Absorptionsmaximum bei 635 nm (Abb. 1). Nach Zusatz von Präparat 1 beispielsweise kam es zu negativer und positiver Metachromasie: Unter gleichzeitigem Extinktionsabfall

Abb. 1. Metachromasie von wäßrigen Toluidinblaulösungen in Gegenwart hochmolekularer DNS (Präparat 1). Abszisse: Wellenlänge in nm. Ordinate: Extinktionseinheiten. Alle Lösungen enthielten $14,29 \mu\text{g TB/ml}$. $\circ\circ\circ$ Ohne sonstige Zusätze, $\cdots$ plus $89,6 \mu\text{g DNS/ml}$, $+++$ plus $11,2 \mu\text{g DNS/ml}$, $\triangle\triangle\triangle$ plus $5,6 \mu\text{g DNS/ml}$.

bei 635 nm traten neue Farbqualitäten bei einem TB/DNS-Konzentrationsverhältnis von 0,16, 1,28, bzw. 2,55 auf, deren Absorptionsmaxima bei 655, 585 bzw. 555 nm lagen. Im jeweiligen Absorptionsmaximum verhielten sich die Maximalextinktionen bei 555, 585, 635 bzw. 655 nm wie 1 : 1,14 : 2,08 : 1,98 (Abb. 1).

Während die positive Metachromasie von TB bei 585 nm alle untersuchten Nucleinsäurepräparate umfaßte, trat sie bei 555 nm bevorzugt bei hochmolekularen DNS-Präparaten auf (Tab. 1 und 2). Dem Extinktionszuwachs bei dieser Wellenlänge war dabei ein Extinktionsabfall bei 585 nm korrelativ. Um Interferenzen des langwelligeren Bereichs weitgehend auszuschließen, wurde den weiteren Aussagen der jeweils zwischen 530 und 570 nm erzielte Extinktionsunterschied zugrunde gelegt.

Der in Tab. 1 an Hand einiger Beispiele dargestellte prozentuale Bezug der bei 530 nm erzielten Extinktionswerte auf den zugehörigen Extinktionswert bei 570 nm in Abhängigkeit von der Nucleinsäurekonzentration belegt den relativen Extinktionsabfall bei der kürzeren Wellenlänge proportional zur Verkleinerung des Moleküls. Je kleiner andererseits die relative Extinktion bei 530 nm, um so geringer der beiderseitige Extinktionszuwachs (bzw. -abfall) in Abhängigkeit suboptimaler Polyanionenzusätze (Tab. 1).

Präparat	Nucleinsäurekonzentration in $\mu\text{g/ml}$					
	1,4	2,8	5,6	11,2	22,4	44,8
1	55,4	70,1	80,6	66,1	52,5	35,8
11	45,6	47,7	48,2	44,5	41,4	40,5
9	43,8	51,1	59,3	50,9	42,9	40,6
1*	45,0	46,5	49,0	46,6	40,5	36,8
1**	51,4	61,2	68,0	56,5	43,4	—
1***	43,9	42,2	43,3	43,7	42,4	40,4

Tab. 1. Relative Metachromasie von TB bei 530 nm in Gegenwart von Nucleinsäuren. Alle Angaben beziehen sich prozentual auf den bei 570 nm gemessenen Extinktionswert (= 100%). * Präparat 1 hitzedenaturiert, ** — nach Röntgenbestrahlung mit 21,0 kR, *** — in Gegenwart von $6,2 \cdot 10^{-4} \text{ M HN}_3$.

Analog verhielten sich denaturierte DNS-Präparate (Tab. 1).

Besonders kleine Extinktionsdifferenzen erbrachten die Präparate 1, 4 und 6. Der daraus ableitbare Schluß auf einen gegenüber vergleichbaren DNS-Präparaten höheren Ordnungszustand wird durch den bei ersteren stärkeren Zuwachs der Extinktionsdifferenz zwischen den beiden Wellenlängen nach Hitzedenaturierung (Tab. 2) gestützt.

Die zur Erzeugung der bei 555 nm maximal absorbierenden positiven Metachromasie — verglichen mit den übrigen Präparaten — hohe Einwaage der Präparate 4 und 6 verweist auf Nucleinsäure-fremde Beimengungen. Tatsächlich erbrachte die DNS-Bestimmung mit der Dische-Reaktion unter Voraussetzung identischer Einwaagen nur 59% der DNS-Konzentration von Präparat 1. Der Proteingehalt der 10 mg-proz. Lösungen verhielt sich wie 10 : 1. Während alle untersuchten Nucleinsäurepräparate Licht der Wellenlängen 230, 260 und 280 nm wie $(0,470 \pm 0,037) : 1,0 : (0,600 \pm 0,022)$ absorbierten, lautete das gleiche Extinktionsverhältnis für die Präparate 4 und 6: $0,950 : 1,0 : 0,770$ und bestätigt damit ihren höheren Proteingehalt.

Präparat	I	II		III		IV	
Nr.		A	B	A	B	A	B
1	4,2	61,6	85,8	0,156	0,066	65,6	410,6
2	4,2	56,0	80,8	0,185	0,090	14,0	226,7
5	4,2	59,5	76,5	0,200	0,115	30,8	147,8
3	4,2	61,4	81,9	0,201	0,092	39,3	247,8
6	11,2	81,4	82,1	0,071	0,068	184,0	191,0
4	11,2	74,6	75,1	0,114	0,097	111,0	160,4
7	4,2	51,0	52,9	0,254	0,241	4,7	6,6
8	2,8	52,3	52,4	0,235	0,239	3,5	2,0
9	2,8	61,1	60,7	0,147	0,211	4,8	4,3
12	2,8	60,9	60,2	0,188	0,198	11,1	11,1

Tab. 2. Metachromasie von TB in Gegenwart von Nucleinsäuren bei 530 und 570 nm. TB-Konzentration 14,29 $\mu\text{g/ml}$ Ansatz. *Spalte I*: Nucleinsäurekonzentration (in $\mu\text{g/ml}$) unter den Bedingungen maximaler Metachromasie bei 530 nm. *Spalte II*: Maximaler Extinktionswert bei 530 nm in Prozent, bezogen auf den zugehörigen Extinktionswert bei 570 nm. *Spalte III*: Extinktionsdifferenz zwischen 570 und 530 nm. *Spalte IV*: Zuwachs der Extinktionsdifferenz zwischen 570 und 530 nm nach Hitze-denaturierung des jeweiligen Nucleinsäure-Präparates in Prozent. *Spalten A*: Nucleinsäuren in wäßriger Lösung ohne sonstige Zusätze. *Spalten B*: Nucleinsäuren nach Lösung in 20 mg-proz. Ovalbuminlösungen.

		DNS ohne Proteinzusatz							
Temperatur (°C)		45	60	75					
+%		55	148	226					
Röntgenstrahlen (in kR)		5,25	10,5	21,0		42,0			
+%		20,5	37,3	92,8		155,4			
Sinalost (in 10 ⁻⁴ M)		2,48	4,96	9,92		19,84			
+%		95,5	144,9	177,5		194,4			
DNS in Gegenwart von Albumin oder Globulin (20 mg-%)									
Temperatur [°C]		20	30	40	50	60	70	80	90
+%		—	85	201	261	321	342	342	349
Röntgenstrahlen (in kR)				0,88	1,75	3,50	7,0		
+%				7,7	24,6	44,6	84,6		
Ultraschall (Beschallungsdauer in min)					0,5	1,0	2,0	4,0	
+%					66,1	91,4	110,2	132,2	
UV-Licht (Bestrahlungszeit in min)					15	30	45	60	
+%					6,9	17,2	72,4	89,7	
Sinalost (in 10 ⁻⁴ M)				1,24	3,10	6,20			
+%				156,5	243,4	298,9			
DNase I (in µg/ml Ansatz)				0,005	0,05	0,5	5,0	50,0	
+%				6,3	15,8	62,1	186,3	218,9	

Tab. 3. Denaturierende Einflüsse in ihrer Wirkung auf die metachromotropen Eigenschaften eines hochmolekularen DNS-Präparates (Präparat 1). TB-Konzentration: 14,29 $\mu\text{g/ml}$, DNS-Konzentration 5,6 $\mu\text{g/ml}$. Angaben des prozentualen Zuwachses der Extinktionsdifferenz zwischen 570 und 530 nm, bezogen auf die nicht-denaturierte Kontrolle. Jeder Wert stellt das Mittel zweier Doppelbestimmungen dar. Durchschnittlicher Variationskoeffizient aller Meßreihen 6,3 (4,9–6,8) Prozent.

Vor allem der letztere Befund veranlaßte aber zu der Annahme, daß Lösung hochmolekularer DNS in Gegenwart von Protein zu metachromotropen Präparaten mit dem Erscheinungsbild höherer Nativität führt. Diese Annahme wird gestützt 1. durch den Abfall der Extinktionsdifferenzen zwischen 570 und 530 nm bei Lösung hochmolekularer DNS in Gegenwart von Protein, 2. das Ausbleiben dieser Erscheinung bei DNS-Präparaten kleinen Mol.-Gew. und RNS und 3. den starken Temperatureffekt bei DNS hohen Mol.-Gew. und sein Ausbleiben bei kleinmolekularen DNS-Präparaten und der RNS (Tab. 3). Das gleiche gilt sinngemäß für denaturierende Einflüsse anderer Art (ibid.).

Die das Auftreten von Metachromasie bei 555 nm begünstigende Wirkung zeigten Albumin- und Globulinpräparate qualitativ gleichwertig. Unterschiedlich waren die dafür optimalen Proteinkonzentrationen (Tab. 4).

Protein				
[mg-proz.]	20	10	5,0	2,5
Ovalbumin	0,063	0,066	0,085	0,166
(Präp. 2)				
Ovalbumin	0,101	0,161	0,190	0,210
(Präp. 3)				
β -Globulin	0,079	0,093	0,137	0,180

Tab. 4. Extinktionsdifferenz 570–530 nm einer wäßrigen TB-Lösung in Gegenwart von Präparat 1 und Protein in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. TB-Konzentration: 14,29 $\mu\text{g/ml}$, DNS-Konzentration: 5,6 $\mu\text{g/ml}$.

Hitzenaturierte Proteine waren praktisch gleich wirksam. Nachträglicher Zusatz von Protein zu wäßrigen DNS-Lösungen blieb ohne Einfluß.

Auch der Umfang der „Denaturierung“ hängt von der Proteinkonzentration ab: Wurde beispielsweise wäßrig gelöste DNS (Präparat 1, 5,6 µg/ml) in Gegenwart von β -Globulin entsprechend Endkonzentrationen von 40, 20, 10, 5 bzw. 2,5 mg-proz. mit 12 kR röntgenbestrahlt, vergrößerte sich die Extinktionsdifferenz zwischen 570 und 530 nm um 87,5, 149,3, 125,0, 74,1 bzw. 51,5 Prozent.

Diskussion

Zu den wesentlichsten Voraussetzungen für das Auftreten von Metachromasie gehört die genaue räumliche Orientierung kationischer Farbstoffmoleküle an der polyanionischen Oberfläche metachromotropen Materials¹⁻⁵. „Le colorant se comporte comme s'il était polymérisé“³. An der Ausbildung solcher Wechselwirkungen sind u. a. polare Bindungen und Van der Waals-Kräfte beteiligt¹⁻⁵. Das Reaktionsmilieu ist mithin von ausschlaggebender Bedeutung¹⁻⁶. Als Lösungsmittel für metachromatische Färbungen wird dest. Wasser bevorzugt, da es die Dissoziation von kationischen und anionischen Gruppen ermöglicht¹.

Neben dem Reaktionsmilieu ist das Konzentrationsverhältnis Farbstoff : Polyanion entscheidend. Je höher dieser Quotient, um so höher im allgemeinen der „metachromatische Index“ (l. c. ^{1-6, 11-14} sowie vorliegende Befunde). Bestimmte „Polymerisationsgrade“ treten dabei bevorzugt in Erscheinung (ibid., vorliegende Befunde).

Ändern sich bei Konstanz des Reaktionsmilieus — etwa unter dem Einfluß physikalischer Noxen (l. c. ^{11, 15-17}, vorliegende Befunde) — die metachromotropen Eigenschaften eines Polyanions, so ist dies als Ausdruck von Änderungen seiner Molekülstruktur zu werten (l. c. ^{5, 11, 15, 16} u. a.). Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, daß die bei 555 nm auftretende metachromatische Qualität von TB in Gegenwart von Nucleinsäuren als Funktion räumlich geordneter, wahrscheinlich helikaler Strukturen aufgefaßt werden kann. Berücksichtigt man, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen beispielsweise bereits Röntgenstrahlendosen im Bereich der DL_{50/30} der Maus und darunter¹⁸ nachgewiesen werden konnten, so ergibt sich zudem — auch im Vergleich mit analogen In vitro-Systemen¹⁹⁻²¹ — die besondere Empfindlichkeit der Versuchsanordnung. Da Proteinzusatz die Metachromasie von TB in Gegenwart hochmolekularer DNS bei 555 nm erhöht, folgt, daß dieses System in seiner metachromotropen Eigenschaft gegenüber TB als Annäherung an ein natives DNS-Protein-Modell gewertet werden kann.

¹¹ F. I. BRAGINSKAYA i I. E. ELPINER, Biofizika **9**, 40 [1964].

¹² Y. FUSE, K. MIYAKI, and M. TSUBOI, Bull. chem. Soc. Japan **38**, 1039 [1965].

¹³ M. E. LAMM, L. CHILDERS, and M. K. WOLF, J. Cell Biol. **27**, 313 [1965].

¹⁴ A. MIURA and Y. OHBA, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **145**, 436 [1967].

¹⁵ M. SEMMEL et J. HUPPERT, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. **254**, 3746 [1962].

¹⁶ M. SEMMEL et J. HUPPERT, ibid. **256**, 5649 [1963].

¹⁷ M. SEMMEL et J. HUPPERT, Arch. Biochem. Biophysics **108**, 158 [1964].

¹⁸ K. TEMPEL, Zbl. Veterinärmed., Erg.-Band 8.

¹⁹ M. VOGT u. E. HARBERS, Strahlentherapie **133**, 426 [1967].

²⁰ H. HARRINGTON, J. molecular Biol. **15**, 152 [1966].

²¹ H. WEINERT u. U. HAGEN, Strahlentherapie **136**, 204 [1968].