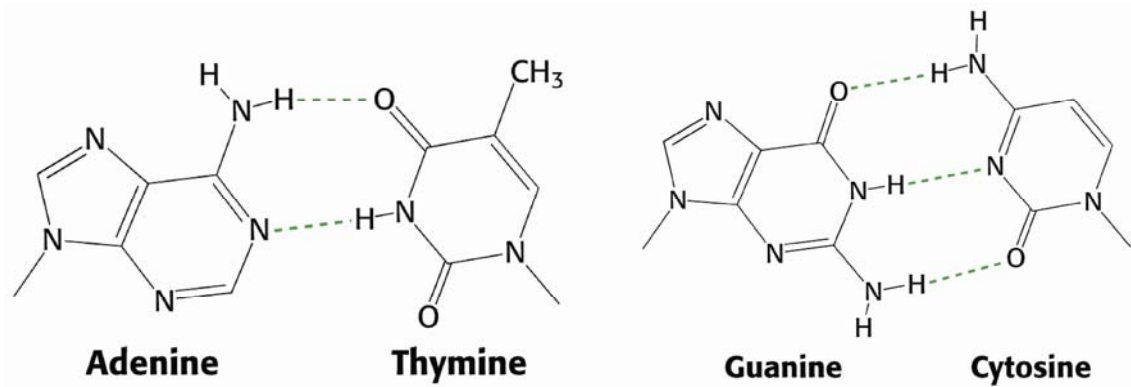


# Thermodynamische Untersuchungen an Nucleinsäuren

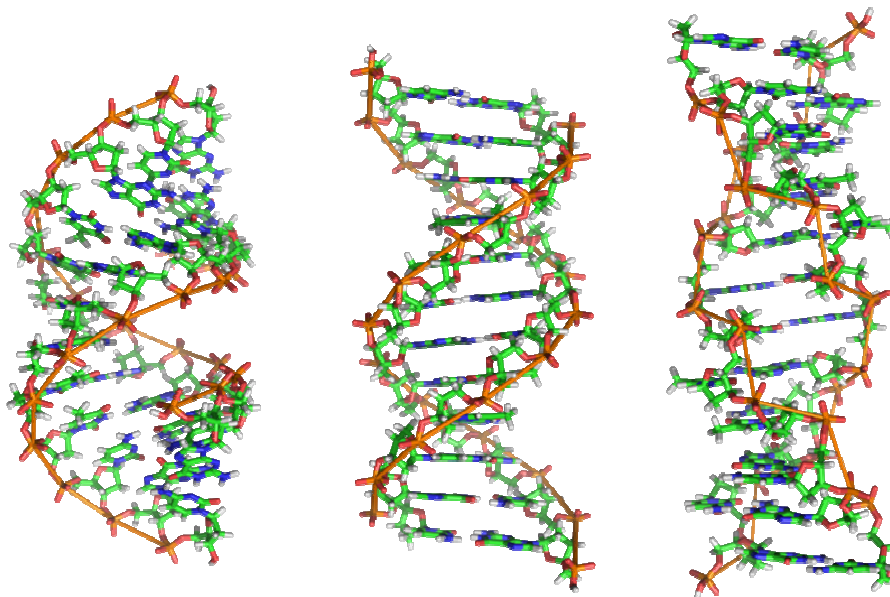
## 1. Nucleinsäuren

In einer Doppelhelixstruktur aus Nucleinsäuren sind die antiparallel verlaufenden Stränge über spezifische „Watson-Crick“-Basenpaare miteinander verbunden (siehe Abb. 1).



**Abb. 1:** DNA-Basenpaare nach Watson und Crick. [J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry 5<sup>th</sup> edition]

Thymin (bei DNA) und Uracil (bei RNA) sind zu Adenin, Cytosin ist zu Guanin komplementär. Die Stabilität der Helix wird dabei durch die Wasserstoffbrückenbindungen (ca. 20 kJ/mol in H<sub>2</sub>O) zwischen den Basen und durch das Stapeln (zwischen 20,1 kJ/mol für CpG bis 35,1 kJ/mol für ApU) aufeinander folgender Basen erreicht. Im Detail lassen sich für Nucleinsäuren drei Helixtypen unterscheiden. Dies sind die A-, B- sowie die Z-DNA. In vivo herrscht dabei die B-Form vor.



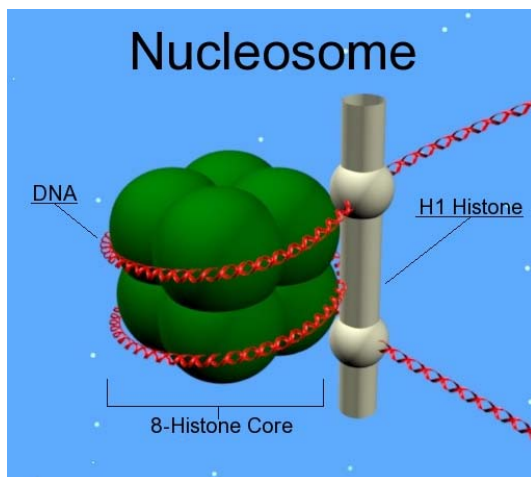
**Abb. 2:** Von links nach rechts: Strukturmodelle der A-, B- und Z-DNA mit jeweils 12 Basenpaaren. [www.wikipedia.org]

Neben typischen „Watson-Crick“-Basenpaaren können in Organismen aber auch Basenpaarungen auftreten, die von diesem Schema abweichen. Solche Paarungen können wie im Falle der tRNA bestimmend für eine sich ausbildende Sekundär- und/oder Tertiärstruktur sein.

## 2. Histone

In der Zelle sind Nucleinsäuren zum größten Teil mit Proteinen komplexiert. Die Proteine dienen hier als Degradationsschutz oder haben Regulations- bzw. Transportfunktionen. Von einigen Proteinen ist bekannt, dass durch Wechselwirkungen mit den Nucleinsäuren die Sekundär- und vor allem die Tertiärstruktur der Nucleinsäuren stabilisiert werden.

Entsprechend ihrer grundsätzlichen Funktion bei der Organisation der DNA sind die Histonproteine in allen Eukaryonten sehr ähnlich und enthalten jeweils einen hohen Anteil an den basischen Aminosäure Lysin und Arginin, deren positive Ladung mit den negativen Ladungen der DNA in Wechselwirkung tritt. Für die Assoziation der Histone untereinander sind außerdem apolare Aminosäurereste von Bedeutung.



**Abb. 3:** Das Nucleosom setzt sich aus mehreren Histonproteinen (H2A, H2B, H3, H4 und H1) und einem Teilabschnitt der DNA zusammen. [www.wikipedia.org]

Das größte Detailwissen auf molekularer Ebene existiert über die unterste Organisationsstufe, der so genannten Nucleosomenstruktur. Im Elektronenmikroskop lässt sich deutlich erkennen, dass globuläre Untereinheiten mit einem Durchmesser von ca. 7 nm regelmäßige, perlenkettenartige Aggregate bilden. Je zwei Histon-Moleküle der Typen H2A, H2B, H3 und H4 bilden einen oktameren Komplex, um den 140 +/- 2 Basenpaare in 1,8 helikalen Windungen gewickelt sind (Abb. 3). An DNA-Abschnitte, die mit den Histonoktameren nicht direkt in Kontakt stehen (Linker-DNA), bindet ein weiteres Histon (H1). Es bedeckt etwa 20 Basenpaare und unterstützt die Ausbildung spiralförmig gewundener Überstrukturen mit 30 nm Durchmesser, so genannter Solenoide. Alle eukaryotischen Systeme zeigen diese Organisationsform.

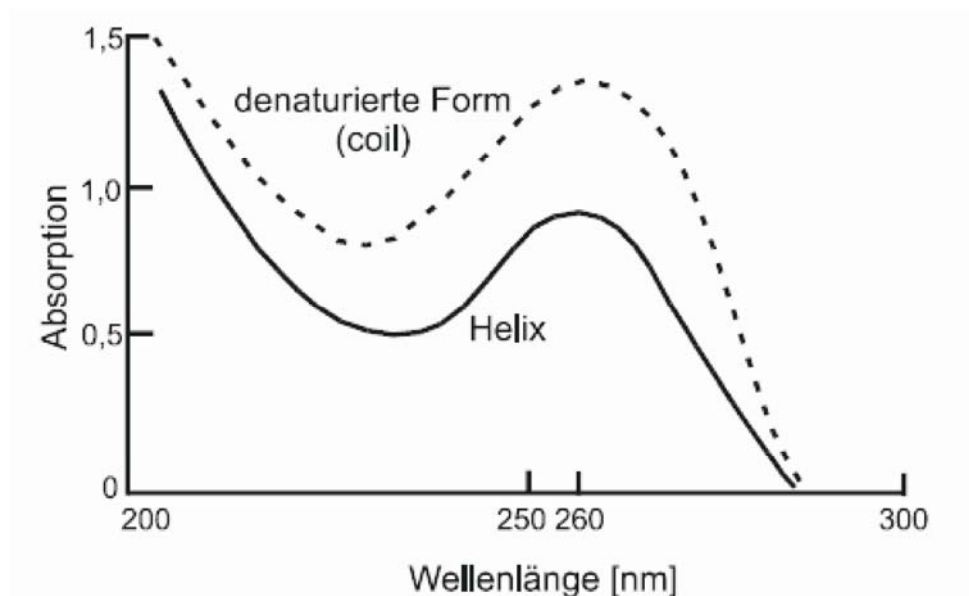
### 3. Thermische Stabilität

Doppelhelices lassen sich durch Zufuhr von thermischer Energie in Einzelstränge überführen. Dieser Übergang wird als Helix-Knäuel- (helix-coil)-Übergang bezeichnet. Die Stabilität doppelhelikaler Bereiche basiert auf der Ausbildung der basenspezifischen Wasserstoffbrücken und auf so genannten Stapelwechselwirkungen zwischen unmittelbar benachbarten Basenpaaren. Es handelt sich hierbei um induzierte Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den benachbarten aromatischen Ringsystemen der Nukleotide. Der durchschnittliche Basenpaarabstand beträgt bei DNA (B-Form) 3,46 Å.

Die freie Enthalpie  $\Delta G$  der Umwandlung setzt sich nach  $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$  (Gibbs-Helmholtz) aus einem enthalpischen und einem entropischen Beitrag zusammen. In den entropischen Term geht die Zunahme von ungebundenen Molekülen beim Schmelzen in Einzelstränge ein. Zum enthalpischen Term tragen nahezu ausschließlich die Stapelwechselwirkungen und die Wasserstoffbrückenbindungen bei. Die Auflösung einer Basenstapelwechselwirkung entspricht einer Gesamt-Enthalpiezunahme von  $\sim 25$  kJ/mol. Die Reaktionsenthalpie bei der Bildung eines Doppelstranges aus  $n$  Basenpaaren mit  $n-1$  Stapelwechselwirkungen beträgt also etwa  $(n-1) \cdot 25$  kJ/mol je Doppelstrang.

### 4. Hypochromie

Für das Detektieren des Helix-Knäuel-Übergangs macht man sich die Eigenschaft von Nucleinsäuren zunutze, im helikalen Zustand eine niedrigere UV-Absorption zu zeigen als im Knäuelzustand (Hypochromie) (Abb. 4).



**Abb. 4:** Hypochromieeffekt beim Denaturieren einer Nucleotid-Doppelhelix.

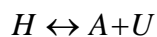
In einem Absorptionsspektralphotometer kann der Hypochromieverlauf in Abhängigkeit von der Temperatur verfolgt werden. Die Ursache der Hypochromie liegt in der Wechselwirkung

zwischen benachbarten Chromophoren. Die Stärke der Hypochromie ist umgekehrt proportional zur dritten Potenz des Abstandes zwischen den wechselwirkenden Chromophoren. Sie wird daher nur bei eng gepackten Chromophoren beobachtet und ist ein einfaches quantitatives Maß für die Bildung oder Auflösung geordneter Strukturen. Die Hyperchromie ist direkt proportional zum Anteil  $\Theta$  (Theta) der dissoziierten Basenpaare.  $\Theta$  bezeichnet man als Umwandlungsgrad des Systems.

Eine für jede Probe charakteristische Temperatur bei der Hälfte der vollen Absorptionsänderung kann als Mittelpunkt- oder Schmelztemperatur  $T_m$  definiert werden. Diese Benennung geschieht in phänomenologischer Analogie zu den in engen Temperaturintervallen verlaufenden Schmelzprozessen von Kristallen. Einzelstränge ändern über einen wesentlich größeren Temperaturbereich ihre Absorption. Wie bei den Doppelsträngen ist der hypochrome Effekt auf die Aufhebung von Stapelwechselwirkungen zurückzuführen.

## 5. Konformationsumwandlung linearer Biopolymere

Das einfachste Modell, mit dem wir eine Konformationsumwandlung beschreiben können, ist ein Übergang einzelner Elemente eines Polymers von einem Zustand, z.B. poly-A und poly-U in einen anderen, z.B. H (Helix). Wir können also folgende Reaktion formulieren.



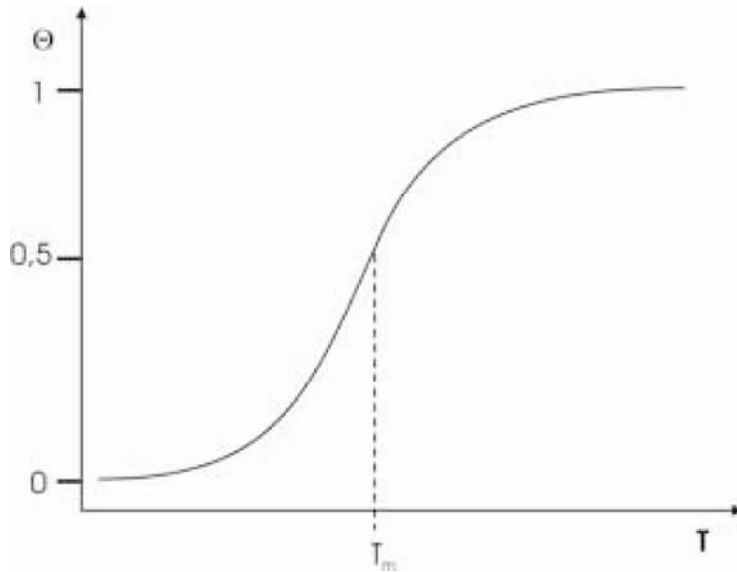
und erhalten für die Gleichgewichtskonstante K

$$K = \frac{[A][U]}{[H]} \quad \text{Gl.(1)}$$

Der Umwandlungsgrad  $\Theta$  ist definiert als

$$\Theta = \frac{[A]}{[A] + [H]} \quad \text{Gl. (2)} \quad \begin{array}{l} [A] = [U] \text{ Konzentration der Einzelstränge} \\ [H] \text{ Konzentration der Helix} \end{array}$$

und kann nur Werte  $0 \leq \Theta \leq 1$  annehmen. Da der Umwandlungsgrad  $\Theta$  eine Funktion der Temperatur ist, kann er aus optisch gemessenen Schmelzkurven leicht ermittelt werden (Abb. 5). Einem breiten Vorschmelzeffekt bei  $T < T_m$  folgt ein hochkooperativer Denaturierungsprozess. Der Schmelzpunkt  $T_m$  ist diejenige Temperatur, bei der  $\Theta = 0,5$  ist.



**Abb. 5:** Schematischer Verlauf einer thermischen Umwandlungskurve von poly-U/poly-A.

Daraus ergibt sich der Zusammenhang des Umwandlungsgrads  $\Theta$  mit der Gleichgewichtskonstanten  $K$ , da am Kurvenverlauf ablesbar für  $[A] = [U] = \Theta [H_0]$  und  $[H] = (1-\Theta) [H_0]$  gilt:

$$K = \frac{\Theta^2}{(1-\Theta)} [H_0] \quad \text{Gl. (3)} \quad [H_0] \text{ Anfangskonzentration der Helix am Punkt } \Theta = 0$$

Die Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten  $K$  von der Temperatur  $T$  ist durch die van't Hoff Beziehung gegeben:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H_{vH}}{RT^2} \quad \text{Gl. (4)}$$

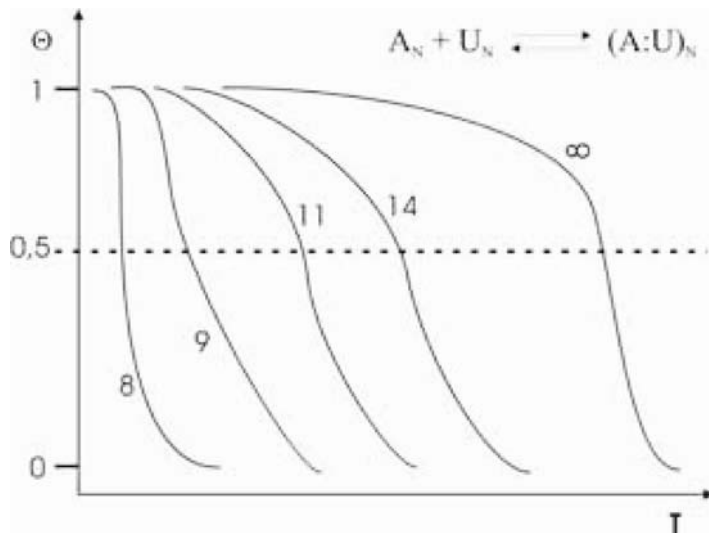
Die Enthalpie am Schmelzpunkt der Umwandlungskurve kann aus dem Zusammenhang der van't Hoff Beziehung und dem Umwandlungsgrad  $\Theta$  errechnet werden, der für eine bimolekulare Reaktion gegen ist durch:

$$\Delta H_{vH} = 6RT_m^2 \left. \frac{d\Theta}{dT} \right|_{T_m} \quad \text{Gl. (5)}$$

Da dieser Zusammenhang aus der van't Hoff Beziehung hervorgeht, heißt das so bestimmte  $\Delta H$  auch die van't Hoff'sche-Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{vH}$ . Die Steigung am Punkt  $T_m$  ist übrigens nicht zwangsläufig die maximale Steigung der Umwandlungskurve. Diese Gleichsetzung gilt nur angenähert für die relativ scharfe Übergänge.

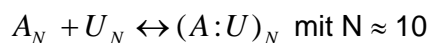
## 6. Kooperativität

In Abb. 6 sind einige Beispiele für Strukturumwandlungen von Nukleinsäuren und Polypeptiden dargestellt. Offenbar hängt der Schmelzpunkt  $T_m$  und die Steilheit der Kurve am Schmelzpunkt, d.h. also  $\Delta H_{vH}$  von der Kettenlänge ab.



**Abb. 6:** Einzelstrang-Doppelstrang Umwandlung von Ribonukleotiden verschiedener Länge. Die Zahlen an den Kurven bezeichnen den Polymerisationsgrad  $N$ .

So ist zum Beispiel für die Einzelstrang-Doppelstrang-Umwandlung von  $(A:U)_{10}$  das  $\Delta H_{vH}$  ca. -420 kJ/mol, während das tatsächliche, also kalorimetrisch bestimmte  $\Delta H$  pro Basenpaar  $\Delta H_{cal}$  nur -25 kJ/mol beträgt.  $\Delta H_{vH}$  ist die mittlere Enthalpie für die Reaktion zwischen den hauptsächlich besetzten mikroskopischen Spezies. Offensichtlich muss also die hauptsächlich stattfindende Reaktion beschrieben werden als



Praktisch alle Basenpaare werden hier in einem einzigen Schritt gebildet bzw. geöffnet. Die Bildung des ersten Basenpaares scheint die Entstehung weiterer Basenpaare zu begünstigen. Ein solches Verhalten bezeichnet man auch als „kooperativ“.

$$n = \frac{\Delta H_{vH}}{\Delta H_{cal}} \quad \text{Gl. (6)}$$

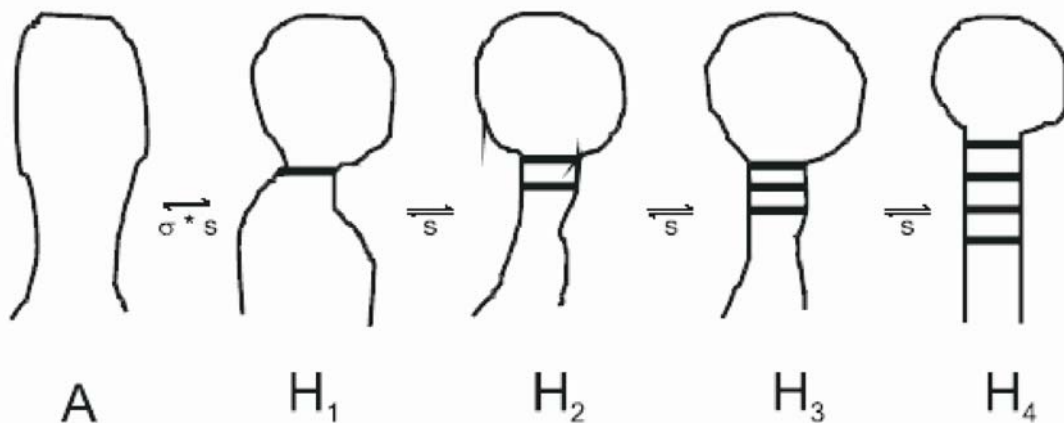
Ein Vergleich von  $\Delta H_{vH}$  und  $\Delta H_{cal}$  erlaubt eine Aussage über das Ausmaß der Kooperativität einer Umwandlung. Wie in Abb. 6 zu erkennen ist, ist die Steigung der Umwandlungskurven auch bei sehr großen Kettenlängen begrenzt.

## 7. Das „Alles-oder-Nichts“-Modell

Die Bildung und Auflösung von Basenpaaren verläuft also kooperativ. Um den Schmelz- bzw. Bildungsvorgang kinetisch zu beschreiben, wird für die Bildung eines Basenpaares in der unmittelbaren Nachbarschaft zu einem intakten Basenpaar die Gleichgewichtskonstante  $K = s$  angenommen. Im Gegensatz dazu gilt für die Bildung des ersten Basenpaares:

$$K = \sigma \cdot s$$

Demnach stellt  $\sigma$  ein Maß dafür dar, wie viel unwahrscheinlicher die Bildung des ersten Basenpaares im Vergleich zu allen weiteren ist und bestimmt so die Kooperativität der Reaktion. Als Grenzfall einer kooperativen Reaktion gilt der „Alles-oder-Nichts“-Mechanismus, d.h., nur die vollständig denaturierte und die vollständig basengepaarte Struktur können existieren. Wie sich leicht erkennen lässt, wird dies erreicht, wenn die Konstante  $\sigma \ll 1$  ist.



**Abb. 7:** Strukturbildungsmechanismus einer Haarnadelhelix.

Für die Reaktion  $A \leftrightarrow H_4$  gilt nach Abb. 7:

$$K' = \sigma \cdot s^4 \quad \text{Gl. (7)}$$

Für den angenommenen Fall des „Alles-oder-Nichts“-Mechanismus, der keine Zwischenstufen H<sub>1</sub> bis H<sub>3</sub> vorsieht, ist im Schmelzpunkt  $K' = 1$ .

Kinetische Experimente zeigten jedoch, dass der Mechanismus nach Abb. 7 einer Modifizierung bedarf, denn die Bildung des ersten Basenpaares stellt noch nicht den Nukleationskeim für das Helixwachstum dar. Mit anderen Worten, erst die Bildung des zweiten oder dritten Basenpaares führt zu einem Nukleationskeim, der die fortschreitende Helixbildung gegenüber der Dissoziationsrückreaktion favorisiert (geschwindigkeits-

bestimmender Schritt).  $\sigma$  muss somit als  $\sigma_1$  und  $\sigma_2$  mindestens für die ersten zwei Gleichgewichte  $A \leftrightarrow H_1 \leftrightarrow H_2$  aufgeteilt werden.

## 8. Der Einfluss der Temperatur auf das Chemische Gleichgewicht

Chemische Reaktionen streben einem dynamischen Gleichgewicht zu, d.h., es liegen sowohl Edukte als auch Produkte vor, aber die Zusammensetzung des Gemisches bleibt konstant. Befindet sich ein Gemisch im chemischen Gleichgewicht, so ist  $\Delta G$  im Minimum. Die Reaktion kann nicht freiwillig in Richtung der Edukte oder Produkte weiterlaufen.

$\Delta G = 0$  wenn  $p, T = \text{konstant}$

Nach dem Prinzip von Le Chatelier ist daher zu erwarten, dass sich das Gleichgewicht bei Erhöhung der Temperatur verschiebt. Eine endotherme Teilreaktion wird bei der Erhöhung der Temperatur begünstigt, weil das System dabei Wärme aufnimmt. Das Gleichgewicht wird zugunsten der Produkte verschoben. Analog begünstigt eine Temperaturabnahme die exotherme Reaktion. Diese setzt Wärme frei und wirkt so der Abkühlung des Systems entgegen. Der Zusammenhang zwischen der Gleichgewichtskonstanten  $K$  und der molaren Freien-Standard-Reaktionsenthalpie kann geschrieben werden als:

$$\ln K = \frac{-\Delta G}{RT} \quad \text{Gl. (8)}$$

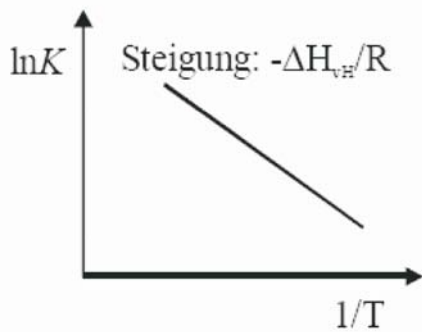
Die Gibbs-Helmholtz-Gleichung gibt den Zusammenhang zwischen Temperaturabhängigkeit von  $G$  und der Enthalpie  $H$  wieder. Bei konstantem Druck lautet die Gleichung dann

$$\frac{d \frac{\Delta G}{T}}{dT} = -\frac{\Delta H_{vH}}{T^2} \quad \text{Gl. (9)}$$

wobei  $\Delta H_{vH}$  die Reaktionsenthalpie bei der Temperatur  $T$  ist. Bei Kombination von Gleichung (8) und (9) ergibt sich die van't Hoffsche Reaktionsisobare:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H_{vH}}{RT^2} \quad \text{Gl. (10)}$$

Leitet man Gleichung (10) mit  $d(1/T)/dT = -1/T^2$  nach  $dT$  ab, ist es möglich  $\Delta H_{vH}$  über eine graphische Auswertung zu bestimmen (Abb. 8). Das Verfahren stellt eine nicht-kalorimetrische Methode zur Bestimmung von  $\Delta H_{vH}$  dar.



**Abb. 8:** Exemplarische Darstellung eines van't Hoff Diagramms

Ist  $\Delta H_{vH} < 0$ , verläuft die Reaktion exotherm, bei  $\Delta H_{vH} > 0$  endotherm. Die erste Form der van't Hoff'schen Reaktionsisobare sagt aus, dass  $d\ln K/dT < 0$  für alle Reaktionen, die unter Standardbedingungen exotherm verlaufen. Eine negative Steigung bedeutet, dass  $\ln K$  und auch  $K$  selbst bei einer Temperaturerhöhung abnehmen. Deshalb wird sich das Gleichgewicht einer exothermen Reaktion bei einer Temperaturerhöhung zu den Reaktionsprodukten hin verschieben.

### 9. Ionenstärkeabhängigkeit des $T_m$ -Wertes

Die negativ geladenen Phosphatrückgrate der Nukleinsäuren stoßen sich gegenseitig ab und führen somit zu einer Destabilisierung der Doppelhelix. Wird die Abstoßung durch Gegenionen gemindert, erhält man folglich eine Stabilisierung der Helix. Das heißt, mit zunehmender Ionenstärke verschiebt sich das Denaturierungsgleichgewicht auf die Seite der Doppelstränge, wodurch die Erhöhung des  $T_m$ -Wertes eintritt.

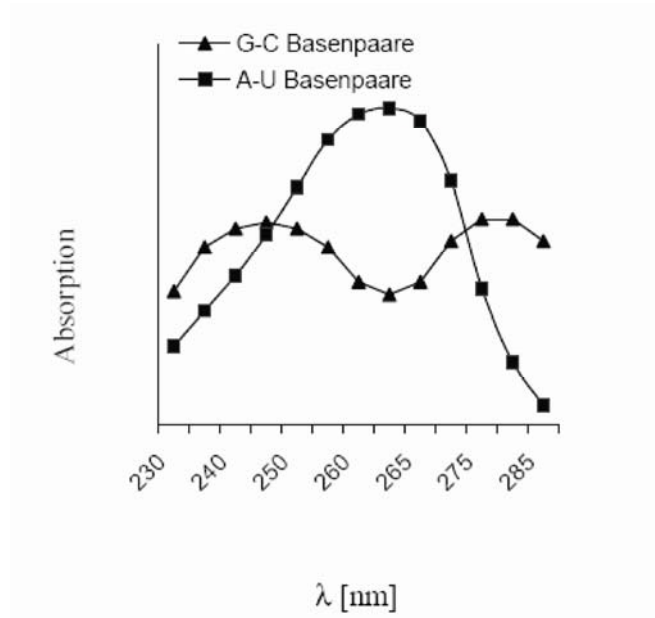
Die Ionenstärkeabhängigkeit des  $T_m$ -Wertes ist bei Tertiärstrukturen, wie z.B. der L-Form von tRNAs, höher als bei Sekundärstrukturen, da sie eine noch höhere Ladungsdichte und damit gegenseitige Abstoßung besitzen. Mehrwertige Ionen wie z.B.  $Mg^{2+}$  stabilisieren aufgrund ihrer höheren Ladungsdichte komplexere Strukturen besser als einwertige Ionen wie z.B.  $Na^+$ .

### 10. Effekt der Basenzusammensetzung auf den $T_m$ -Wert

Im Gegensatz zu dem synthetischen System poly-A/poly-U zeichnet sich eine natürliche DNA vorrangig dadurch aus, dass sie sowohl A:T- als auch G:C-Paare enthält, deren Sequenz in der so genannten Primärstruktur festgelegt ist. Die thermodynamische Stabilität von A:T- und G:C-Paaren ist sehr unterschiedlich. Über längere Bereiche können A:T-reiche oder G:C-reiche Clusterstrukturen auftreten, die unabhängig voneinander denaturieren können. Deshalb beobachtet man verbreiterte und sogar mehrstufige Denaturierungskurven. Die thermodynamische Heterogenität ist von großem biologischen Interesse seit bekannt ist, dass wichtige Regulatorsequenzen oder ganze Bereiche des Genoms als A:T- bzw. G:C-Cluster vorliegen.

## 11. Effekt der Basenzusammensetzung auf die Hypochromie

Das Denaturierungsspektrum von A:U-Basenpaaren besitzt ein Maximum bei 260 nm, das von G:C-Basenpaaren zwei Maxima bei 240 und 280 nm. Daher lässt sich durch Messung des Helix-Knäuel-Überganges bei zwei verschiedenen Wellenlängen, z.B. 260 nm und 280 nm der G:C-Gehalt der Doppelhelix bestimmen.



**Abb. 9:** UV-Spektren von A:U- und G:C-Basenpaaren.

### Literatur:

P.W. Atkins, Physikalische Chemie, 1990, VCH-Verlag, Weinheim.

J. Koolman, K-H. Röhm, Taschenatlas der Biochemie, 1998, Thieme-Verlag, Stuttgart.

T. Ackermann, Kalorimetrie von Biopolymeren, Chemie in unserer Zeit, 1977, 11, 97-107.

R. Knippers, Molekulare Genetik, 2001, Thieme-Verlag, Stuttgart.

J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry 5<sup>th</sup> edition, 2002, W.H.Freeman & Co Ltd

## Versuchsablauf

### 1) Bestimmung der Konzentration der poly-U- und poly-A- Stammlösungen:

	$A_{260\text{nm}}$ [L/(mol cm)]	Verdünnungsfaktor	$A_{260\text{nm}}$	c [mol/L]
poly-A	10300	1:100		
poly-U	9100	1:100		

$$[H_0] = [\text{poly-A}] = [\text{poly-U}] =$$

$$[\text{MgCl}_2] = 5 \cdot [H_0] =$$

### 2) Pipettierschema (vorbereitend für NaCl, EDTA und Bis-Tris ausrechnen!):

Stammlösungen Proben	1 M NaCl [ $\mu\text{L}$ ]	10 mM Na <sub>2</sub> EDTA [ $\mu\text{L}$ ]	100 mM Bis-Tris/HCl [ $\mu\text{L}$ ]	1 mM MgCl <sub>2</sub> [ $\mu\text{L}$ ]	H <sub>2</sub> O [ $\mu\text{L}$ ]	poly-A [ $\mu\text{L}$ ]	poly-U [ $\mu\text{L}$ ]
Referenz (19 mM NaCl)				-----			
Probe 1 (19 mM NaCl)				-----			
Probe 2 (39 mM NaCl)				-----			
Probe 3 (69 mM NaCl)				-----			
Probe 4 (99 mM NaCl)				-----			
Probe 5 (20 mM NaCl, MgCl <sub>2</sub> )		-----					
Probe 6 (40 mM NaCl, MgCl <sub>2</sub> )		-----					
Probe 7 (70 mM NaCl, MgCl <sub>2</sub> )		-----					
Probe 8 (100 mM NaCl, MgCl <sub>2</sub> )		-----					

**Gesamtvolumen jeweils 1500  $\mu\text{L}$**

### Endkonzentrationen in den Probelösungen:

[NaCl] variiert je nach Probe (siehe Tabelle); [Bis-Tris/HCl] = **10 mM**; [Na<sub>2</sub>EDTA] = **0,5 mM**

### 3) Wertetabelle für die Tangentialmethode (Probe 1-8):

Probe [NaCl, MgCl <sub>2</sub> ]	log [Na <sup>+</sup> ]	T <sub>m</sub> [°C]	T <sub>m</sub> [K]	d $\Theta$ /dT [K <sup>-1</sup> ]	$\Delta H_{vH}$ [kJ/mol]	Kooperativität n
----------------------------------	------------------------	---------------------	--------------------	-----------------------------------	--------------------------	------------------

Auftragung der Schmelztemperatur gegen log [Na<sup>+</sup>]

### 4) Berechnung für die van 't Hoff-Auftragung (nur für Probe 1-4):

$\Theta$ (0,1-0,9)	K	ln K	T [°C]	T [K]	1/T [K <sup>-1</sup> ] · 10 <sup>3</sup>
--------------------	---	------	--------	-------	--

### 5) Wertetabelle für die van 't Hoff-Auftragung (nur für Probe 1-4):

[Na <sup>+</sup> ]	$\Delta H_{\text{Vorschmelz}}$ [kJ/mol]	n <sub>Vorschmelz</sub>	$\Delta H_{\text{kooperatives Schmelzen}}$ [kJ/mol]	n <sub>kooperatives Schmelzen</sub>
--------------------	---	-------------------------	---	-------------------------------------