

Lichtstreuungsmessungen an nativer DNS*

Von

E. Gruber und J. Schurz

Institut für Physikalische Chemie der Universität Graz

Mit 6 Abbildungen

(Eingegangen am 19. November 1968)

Die stark strukturierten biologischen Makromoleküle zeigen zum Unterschied von künstlichen, statistisch geknäuelten eine komplexe Streufunktion, die eine Auswertung in klassischer Weise problematisch werden läßt. Dagegen ist es möglich, durch Analyse der Streufunktion detaillierte Aussagen über die Tertiärstruktur solcher Moleküle zu machen. Hier stehen wir aber erst am Anfang, und es sind noch sehr viele Probleme ungelöst, die hier nur angedeutet werden können.

Light Scattering Measurements with Native DNS

Strongly structured biological macromolecules show, contrary to synthetic statistically coiled ones, a complex scattering function whose evaluation in the classical way is problematic. On the other hand, by means of scattering curve shape analysis, detailed information on the tertiary structure of such molecules may be obtained. Our experiments are a first beginning, and many problems remain unsolved.

Die Streufunktion von geordneten Makromolekülen

Die Lichtstremethode ist heute schon eine klassische Methode zur Bestimmung des Gewichtsmittels des Molekulargewichtes. Sie beansprucht keinen allzu großen apparativen Aufwand und wird daher sehr häufig angewandt. Auch die Daten über Molekulargewichte von DNS-Präparaten stammen zu einem großen Teil aus Lichtstreuungsmessungen.

* Vortrag, gehalten anlässlich des „Chemikertreffens 1968“ in Wien, 25. bis 27. September 1968.

Das Molekulargewicht kann man zwar aus der absoluten Intensität des Streulichts in der Richtung des eingestrahnten Primärlichts berechnen, doch kann man beim Streuwinkel Null nicht messen, weil das gestreute Licht um einige Zehnerpotenzen schwächer ist als das eingestrahlte Primärlicht und von diesem vollständig überdeckt wird. Man muß die

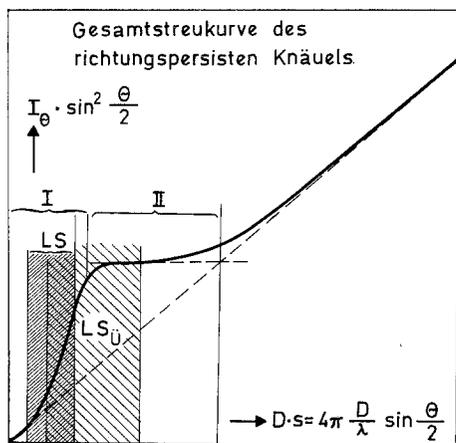


Abb. 1. Schematische Streukurve des richtungspersisten Knäuels

messen. Wie groß dieser Winkelbereich, in dem Linearität herrscht, ist, hängt von der Größe und der Gestalt der streuenden Molekülsorte ab. Dies sei an Hand der Röntgen-Kleinwinkel-(*RKW*)-Streukurve¹ eines irrflugartigen Knäuels mit Richtungspersistenz (Abb. 1) erläutert. D ist eine charakteristische Dimension des Moleküls. Für Knäuelmoleküle verwenden wir hier vorteilhafterweise die Persistenzlänge; meistens ist diese charakteristische Größe wesentlich kleiner als die Wellenlänge des sichtbaren Lichts. Die den Meßwinkeln entsprechenden s -Werte sind daher klein, man mißt im Bereich I. Bei biologischen Makromolekülen ist es aber sehr gut möglich, daß D -Werte in der Größenordnung von 10^3 auftreten und damit an die Wellenlänge des verwendeten Lichts herankommen. Verantwortlich für so hohe D -Werte sind geordnete, anisotrope Tertiärstrukturen. In diesem Fall mißt die Lichtstreuung bei größeren Winkelargumenten (Abb. 1) und sie erfaßt einen breiteren Abschnitt der Streukurve. Dann mißt man also in der Gegend des Überganges von I zu II. Die Streufunktion (I vs. s) fällt dort plötzlich ab, sie weist einen Knick auf.

¹ O. Kratky, Chim. Pure et Appl. 12, 483 (1966).

Null-Streuintensität also durch Extrapolation auf den Winkel Null finden. Diese Extrapolation wird gleichzeitig mit der Extrapolation auf die Konzentration Null im *Zimm*-Diagramm durchgeführt.

Voraussetzung für eine einwandfreie Winkelextrapolation ist natürlich, daß die Winkelabhängigkeit der Streustrahlung in einem noch meßbaren Bereich linear dargestellt werden kann. Bei ganz kleinen Winkeln ist diese Bedingung immer erfüllt, aber man kann nicht immer bis zu so kleinen Winkeln

Die gemessenen Streukurven von *DNS* zeigen tatsächlich so einen Knick mehr oder weniger deutlich, auch in der *Guinier*- $\left(\lg P \text{ vs. } \sin^2 \frac{\theta}{2}\right)$ und in der *Zimm*-auftragung $\left(\frac{1}{P} \text{ vs. } \sin^2 \frac{\theta}{2}\right)$. Im *Zimm*-Diagramm kann aber die Feinstruktur der Streufunktion sehr leicht verlorengehen. Wenn man einen sehr großen Konzentrationsparameter wählt, werden die Streukurven so steil, daß man die Kurvenstruktur nicht mehr sieht, oder wenigstens leicht als Meßfehler interpretieren kann; besonders leicht, wenn man nur wenige Punkte der Streukurve vermessen hat, wie das bisher meist üblich war. Eine Extrapolation auf den Winkel Null ist hier natürlich sinnlos, versucht man sie aber trotzdem, ergibt sich eine viel zu hohe Nullintensität und damit ein zu großer Wert für das Molekulargewicht.

Möglicherweise ist es auf eine solche ungerechtfertigte Extrapolation zurückzuführen, daß die in der Literatur angegebenen *LS*-Molekulargewichte beträchtlich streuen². Bei unseren Messungen an *DNS*-Lösungen haben wir jedenfalls bisher immer gefunden, daß die Streukurve eine kompliziertere, von der statistischen Knäuelstreukurve abweichende Form hat.

Neben diesem systematischen Fehler spielt bei der Messung noch ein ganz trivialer Fehler eine erhebliche Rolle, nämlich die Schwierigkeit, Polyelektrolytlösungen vollständig staubfrei zu machen. Staubpartikel streuen bekanntlich sehr stark, besonders bei kleineren Winkeln. Auch Molekülassoziationen erhöhen dort die Streuintensität wesentlich. Aus diesen Gründen ist es verständlich, daß man den *LS*-Molekulargewichten von *DNS* und ähnlich stark strukturierten Molekülen gegenüber skeptisch ist. Das hat uns auch bewogen, der Streufunktion selbst genaueres Augenmerk zu schenken.

Experimentelles

Wir verwendeten käufliche, aus Lachssperma isolierte *DNS*, lösten sie unter Kühlung in einem Neutralphosphatpuffer und filtrierten, ebenfalls unter Kühlung, durch Millipore-Filter von 0,5 bis 1 μ Porendurchmesser, um die Lösung zu entstauben. Das Staubbefreiarbeiten ist hier das größte Problem, zu diesem Zweck haben wir eigens eine Reihe von Geräten konstruiert³. Die Messungen selbst wurden in einem Brice-Phoenix-Gerät durchgeführt, an dem einige apparative Modifikationen angebracht worden waren^{3, 4}.

² *Ch. Sadron* und *J. Pouyet*, in: *Physical Chem. of High Polymers of Biolog. Interest*. Pergamon Press, 1956, 52.

³ *E. Gruber*, Dissert. Univ. Graz 1968.

⁴ *J. Schurz*, *E. Gruber*, *G. Warnecke* und *H. Pippin*, *Acta Phys. Austr.* **26**, 211 (1967).

Ergebnisse

Je nach Vorbehandlung ergaben sich bei den einzelnen Präparaten verschiedene Streukurven, die aber eines gemeinsam hatten, nämlich,

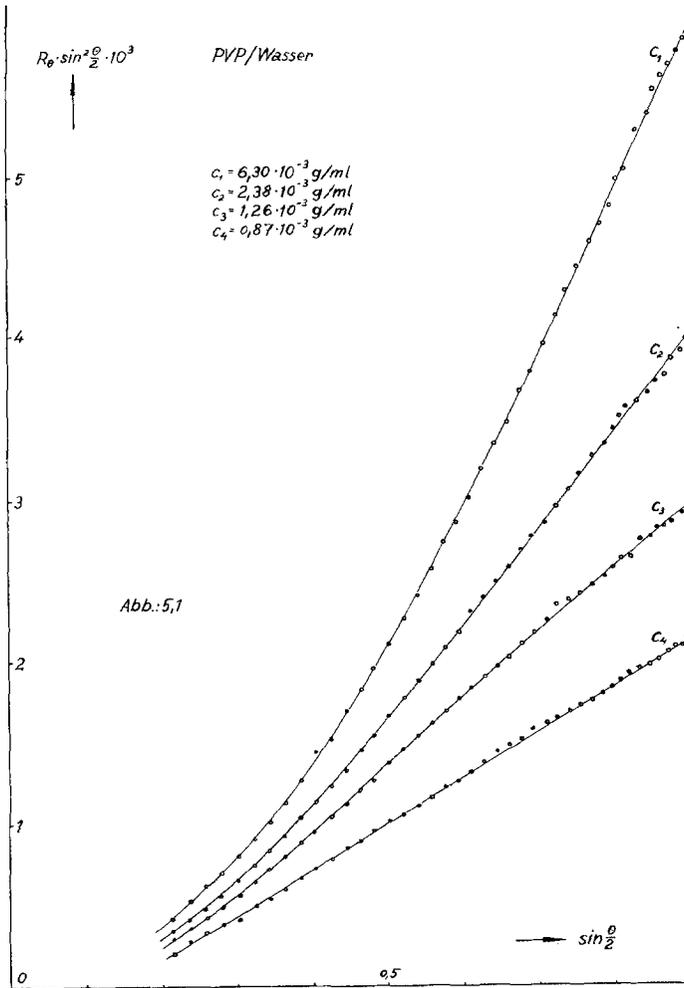


Abb. 2. Streukurven von Polyvinylpyrrolidon in Wasser (Verlauf typisch für statistische Knäuelmoleküle)

daß sie stark von der Streukurve eines statistisch ungeordneten Moleküls abweichen. Solche statistische Streukurven findet man dagegen sehr schön bei manchen künstlichen Hochpolymeren; als Beispiel ist in Abb. 2 die Streukurve von Polyvinylpyrrolidon in Wasser dargestellt. Zum

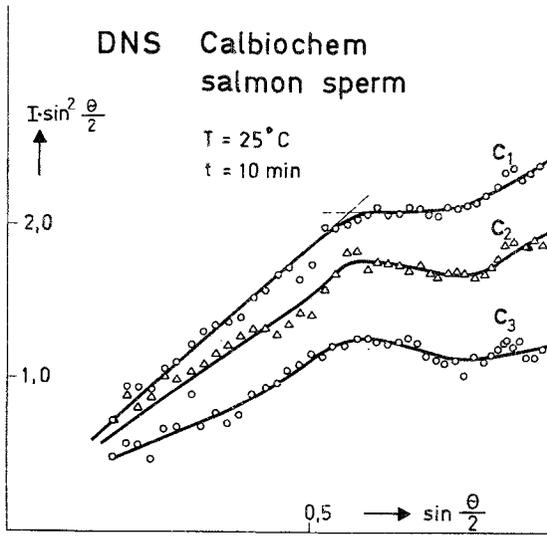


Abb. 3. Streukurven von DNS mit charakteristischer Strukturierung

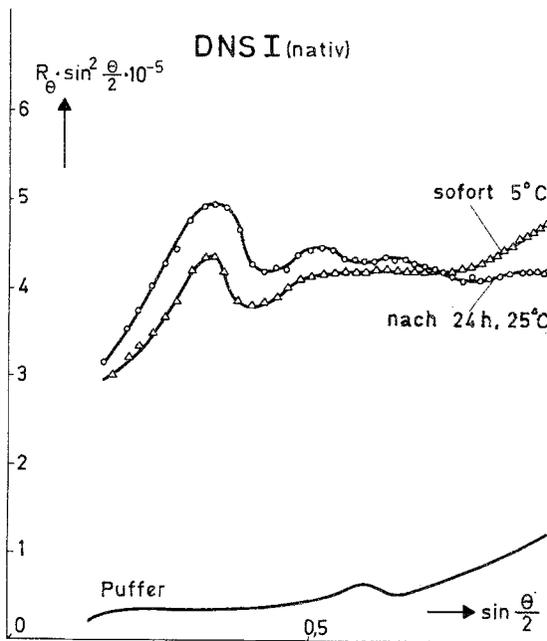


Abb. 4. Streukurven von DNS (nativ), Zeiteffekt

Unterschied davon sind die *DNS*-Streukurven nicht stetig (Abb. 3). Sie zeigen den Verlauf, wie er nach der schematischen Abb. 1 zu erwarten ist; der dort erwähnte „Knick“ ist deutlich zu sehen. Die Streukurven der Abb. 3 entsprechen im allgemeinen *RKS*-Kurven, allerdings transponiert auf wesentlich höhere „*Braggsche*“ Werte der Abszisse. Andere *DNS*-Streukurven sind überdies durch ein deutliches relatives Maximum charakterisiert (Abb. 4), das dem oben erwähnten Streukurvenknick entsprechen dürfte. Daneben und darüber treten auch noch andere Streuphänomene auf, z. B. eine wellenartige Feinstruktur mit relativen Nebenmaxima von ziemlich konstanter Distanz. Bei manchen Präparaten ist eine stark überhöhte Streuintensität bei kleinen Winkeln zu finden (Abb. 5), offenbar durch Assoziation verursacht. Dabei kann es sich nicht etwa um Verunreinigungen durch Staub handeln, denn diese Streuung verschwindet, wenn man die Lösung auf 90° C erhitzt, abschreckt und sofort bei tiefer Temperatur mißt.

Allerdings steigt die Streuung nach einigen Minuten wieder an, was darauf hindeutet, daß sich das Assoziat wieder zurück-

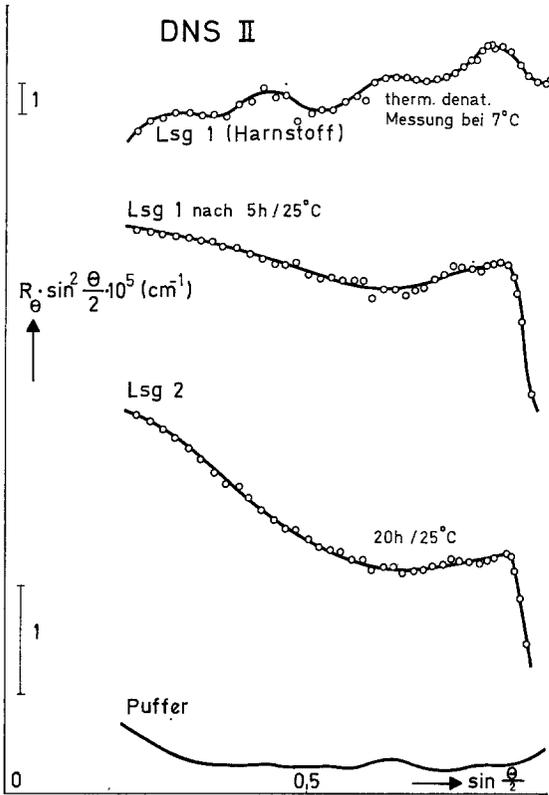


Abb. 5. Streukurven von *DNS* (denaturiert), Zeiteffekt und Einfluß von Harnstoff

bildet. Eine andere Erklärung wäre, daß sich die *DNS*-Helices in der Lösung auf Grund der Abstoßung durch ihre Gegenionenwolken ordnen und die Innenstreuung auf einer solchen intermolekularen Ordnung beruht.

Diskussion der Resultate

Das Bemerkenswerteste an den Streukurven ist der Knick, der bei ein und demselben Präparat fast immer an derselben Stelle, aber verschieden stark ausgeprägt gefunden wird. Aus der Lage des Knicks

läßt sich nun die charakteristische Dimension D berechnen, wenn man die theoretische Lage des Knicks in der „master curve“, der allgemeinen Streukurve, kennt; ganz analog, wie in der *RKW*-Methode die Persistenzlänge ermittelt wird.

Um diesen Punkt zu berechnen, muß man natürlich ein bestimmtes Molekülmodell zugrunde legen. Im Falle der *DNS* gibt es mehrere plausible Möglichkeiten. Einmal kann man eine intakte, etwas flexible Helix annehmen. Das ist wiederum ein „Persistenzmodell“, das von diesem nur in einem, allerdings wesentlichen Punkt abweicht, nämlich, daß die Gesamtlänge des Moleküls nur wenige Persistenzlängen ausmacht (wobei natürlich diese große Persistenzlänge gewissermaßen eine „2. Persistenzlänge“, nämlich jene der Gesamthelix darstellt. Der gekrümmte Molekülfaden hat zusätzlich noch seine eigene „1. Persistenzlänge“, die gewöhnlich

viel kleiner ist und mit der Lichtstreuung nicht, wohl aber mit der *RKW*-Streuung erfaßt werden kann). Oder man kann annehmen, daß entlang der Helix in größeren Abständen Störstellen auftreten, die als Scharniere wirken⁵. Dieses Modell wäre dem *Kuhnschen* Knäuelmodell analog, enthält aber auch nur eine kleine Anzahl von Segmenten. Die Lage des Knickpunktes läßt sich nach dem Modell errechnen, sie ist eine Funktion der Segmentzahl N ; die Streufunktion geht für $N = 1$ in die schon von *Debye* berechnete Streukurve eines einzelnen starren Stäbchens über.

Wenn man nun weiß, wieviele solcher Scharnierstellen im Molekül zu erwarten sind, oder wenn man wenigstens eine plausible Annahme treffen kann, läßt sich die Länge der intakten Helixanteile aus der gemessenen Lage des Knickpunktes berechnen. Bei unseren Messungen wurden Längen zwischen 1700 und 3000 Å erhalten*. Unter Zugrundelegung eines Helixmodells (z. B. *Crick-Watson*) bekommt man dann

I statist. aufgelöst II nicht kooperativ
denaturiert



III lockere geordnete
Struktur IV kooperativ
denaturiert

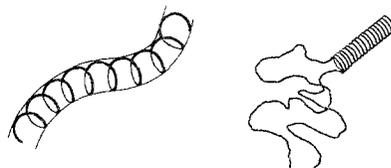


Abb. 6. Schematische Darstellung von Zwischenzuständen bei der Denaturierung von *DNS*

* Unveröffentlichte Versuche.

⁵ Vgl. *B. A. Feodorov, T. M. Birshitejn und O. B. Ptitsyn, Biofizika 8, 288 (1963).*

indirekt das Molekulargewicht. Man kann nun die Helix bis zum statistischen Knäuel denaturieren und versuchen, die Streuung zu messen, solange sich noch keine Ordnung zurückgebildet hat, und in klassischer Weise das Molekulargewicht errechnen. Das ergibt eine Kontrollmöglichkeit für obige Annahmen.

Beide Methoden, sowohl die direkte Messung als auch die indirekte, haben schwache Punkte. Die direkte Methode setzt voraus, daß das Molekül vollständig ungeordnet ist, wobei aber natürlich noch keine Hauptvalenzen gelöst sein dürfen. Die indirekte Methode fußt aber auf einer Reihe von Annahmen, die nicht unbedingt zutreffen müssen. So erscheint uns das Problem der Molekulargewichtsbestimmung in solchen Fällen nicht befriedigend gelöst.

Dagegen kann uns eine Untersuchung der Streukurvenform andere interessante Angaben liefern. Aus der Lage des Streukurvenknicks kann man die Länge der intakten Helixanteile ermitteln. Eine wellenartige Feinstruktur läßt nach einer Rechnung von *Kirste*⁶ auf eine Krümmungspersistenz schließen, was einer Verdrillung der Helix zu einer Superhelix entsprechen würde. Durch Kombination mit hydrodynamischen Meßdaten lassen sich dann weitgehende Aussagen über die Gestalt der Moleküle machen; z. B. kann man zwischen einer einsträngigen und einer Doppelhelix unterscheiden und gewinnt Angaben über die mechanische Stabilität.

Außerdem bietet sich diese Methode für das Studium des Denaturierungsvorganges an. Man kann sich ja verschiedene Denaturierungszustände vorstellen (vgl. Abb. 6). Bei den von uns untersuchten Proben haben wir nur die Formen II und III gefunden, eine statistisch verknäuelte Form (I) war in unseren Meßlösungen nicht beständig.

Zum Schluß sei noch angefügt, daß die früher erwähnte mögliche Ordnung der Moleküle in Lösung — Parallelstellung der Längsachsen bei konstanten Abständen — ebenfalls eine Strukturierung der Streukurve im Sinne einer Abweichung von der statistischen Gestalt hervorrufen könnte. Dieser Effekt sollte konzentrationsabhängig sein. Wir hoffen, daß weitere Studien die aufgezählten Vieldeutigkeiten klären werden.

⁶ R. G. *Kirste*, Makromol. Chem. **101**, 91 (1967).