

Kalorimetrische Messungen an geordneten Chromatin-
untereinheiten.

H.Klump

Institut für Physikalische Chemie, Universität Freiburg (B.R.D.)

Abstract

It is widely accepted that native DNA exists as a highly ordered complex (nucleosomes) of the histon octamer (H2A, H2B, H3, H4)₂ within the chromosomes. This structure can be isolated and purified to yield single nucleosomes which can be dissociated by rising the ionic strength of the solution and which reassociate upon lowering the ionic strength. In this investigation we follow the temperature induced denaturation of isolated nucleosomes by the help of an adiabatic scanning calorimeter and we can correlate the enthalpy changes with the stepwise unfolding of the particles.

Einleitung

Es ist allgemein akzeptiert, daß die DNA in den Chromosomen als geordneter Komplex der vier Histone (H2A, H2B, H3, H4)₂ vorliegt. Diese Strukturen lassen sich isolieren und durch Änderung der Ionenstärke dissoziieren bzw. reassoziieren. Die thermische Denaturierung der Teilchen kann mit Hilfe eines adiabatischen Kalorimeters verfolgt werden und die einzelnen Enthalpieänderungen lassen sich einzelnen Schritten der temperaturinduzierten Entfaltung der Struktur zuordnen.

Aus diesem Thema ergeben sich drei unmittelbare Fragen.

1. Gibt es geordnete Chromatin-Untereinheiten oder anders gefragt: Sind die Chromosomen aus regelmäßigen Baugruppen aufgebaut?
2. Kann man an diesen Untereinheiten etwas Sinnvolles messen, sinnvoll soll heißen, etwas was uns die Struktur und die Funktion der Untereinheiten besser verstehen läßt?
3. Kann die Thermodynamik, die sozusagen ein Kind des vorigen Jahrhunderts ist, eine Methode sein, solche Strukturinformationen zu gewinnen.

Blickt man in ein Lehrbuch der allgemeinen Biologie, der Genetik oder Zellbiologie, so findet man zwar etwas über die Morphologie von Chromosomen, aber es findet sich kein Wort über geordnete Chromatin-Untereinheiten. Wie kommt das? Die Antwort hierauf ist ganz einfach, man wußte bisher nichts darüber und bis dato gab es auch keinen Grund, etwa zur Erklärung experimenteller Ergebnisse, das Vorhandensein von regelmäßigen Untereinheiten zu fordern.

Der erste Hinweis auf spezielle, regelmäßige Grundbausteine des Chromatins ergab sich aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von besonders schonend präpariertem Chromatin¹ aus Kükenerythrozyten.

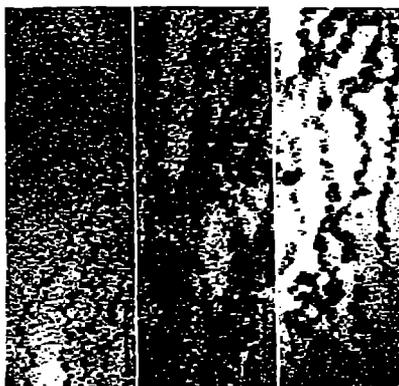


Abb. 1 E.M. Bild von Chromatin von Olins and Olins.

Was wollen wir als Chromatin bezeichnen? Chromatin ist ein Sammelbegriff der leicht färbaren Bestandteile einer Zelle. Die Zelle ist von den Nachbarzellen durch eine Zellwand abgetrennt. Neben vielen kleinen Zellbestandteilen fällt eine Struktur besonders ins Auge, nämlich der durch eine weitere Membran von dem übrigen Zellinhalt abgetrennte Zellkern. Bemüht man sich, weitere Einzelheiten im Zellkern zu erkennen, so sieht man innerhalb des Zellzyklus zu einem bestimmten Zeitpunkt besonders deutlich der Chromosomen. Dabei handelt es sich sozusagen um kondensiertes Chromatin. Die Chromosomen sind die Träger der Erbinformation. Die Hauptkomponenten der Chromosomen sind bestimmte Proteine und die Desoxyribonukleinsäuren. Wahrscheinlich enthält ein Chromosom ein einziges Molekül der DNA. Die DNA stellt das Erbmaterial dar. Auch in geordneten Chromatin-Untereinheiten ist die DNA vorhanden. Wenden wir uns noch kurz den Proteinen in den Chromosomen zu. Pauschal hat sich hier eine Zweiteilung eingeführt. Man teilt die beteiligten Proteine auf in die Nichthiston-Proteine und in die Histone. Die Nichthistone bilden einen ganzen Zoo von verschiedenen Teilchen. Über die Zuordnung

und vor allem über die Funktion der Nichthiston-Proteine ist bisher so gut wie nichts bekannt. Bei den Histonen ist heute schon recht viel bekannt. Die Einzelheiten will ich im Augenblick noch zurückstellen. Betrachtet man ein einzelnes Chromosom (Bild 2) noch genauer, dann fällt einem auf, daß es aus gleichartigen sphärischen Teilchen



Abb. 2 E.M. Bild eines Chromosoms.

aufgebaut ist. Je nach der Vorgeschichte bei der Präparation sind diese sphärischen Teilchen mehr oder weniger eng gepackt. Bei diesen sphärischen Teilchen handelt es sich um die kleinsten, geordneten Untereinheiten des Chromatins. Weitere Einzelheiten dieser Teilchen zu sehen ist leider auch mit Hilfe der besten Elektronenmikroskopie nicht mehr möglich. Da hilft nur noch der Trickzeichner. Die Rolle des Trickzeichners übernimmt heute der Computer. (Bild 3) Das ist, was der Trickzeichner heute als "Nukleosom" oder "N-body", als kleine geordnete Einheit der Chromosomen präsentiert. Sie besteht aus einem dosenförmigen Körper, der aus Histonen gebildet wird, und um diesen Körper mit der Dicke von ca. 55 \AA ist eine DNA-Doppelhelix in $1\frac{3}{4}$ Windungen aufgewickelt. Woher weiß der Trickzeichner das so genau? Nun ja, so genau weiß er es nicht, aber er hat eine Reihe guter Gründe, das Bild

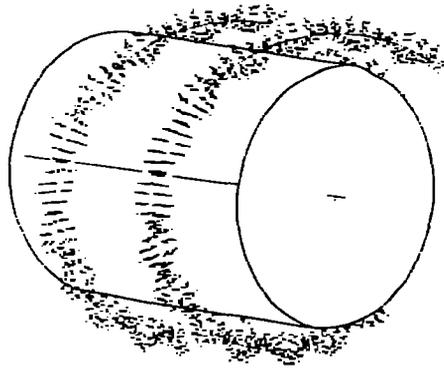


Abb. 3 Computerzeichnung eines Nukleosoms.

eines Nukleosoms so zu zeichnen.

Schauen wir unser Teilchen etwas genauer an. Die DNA ist an der Außenseite der Teilchen, die Proteine befinden sich im Inneren der Struktur. Woher weiß man dieses? Wir können die Argumente für die Richtigkeit des vorgestellten Modells in zwei Gruppen einteilen, ohne damit eine Wertung zu verbinden. Die erste Gruppe der Argumente ergibt sich aus den biochemischen Untersuchungsverfahren. Wenn wir uns nun den biochemischen Verfahren etwas mehr widmen, dann kann man hier vielleicht kurz einfließen lassen wie man präparativ überhaupt zu den Teilchen gelangt². Als Ausgangspunkt der Präparation wählt man sich ein gut zugängliches zelluläres Material. Eine Reihe von Untersuchungen an Nukleosomen sind an Erythrozyten von Vögeln, sprich Küken gemacht worden. Das hat einen Hauptgrund darin, daß es sich hier um ein besonders leicht zugängliches, billiges Ausgangsprodukt handelt. Die hier vorgestellten Ergebnisse der physikalisch-chemischen Messungen sind auch an Nukleosomen aus Kükenerthrozyten erzielt worden³. Die zweite einge-

fürte Quelle für Chromatin ist die Rattenleber. Wir haben einen Teil unserer Untersuchungen an Rattenleberchromatin durchgeführt. Ich will die Skeptiker unter Ihnen beruhigen: Kükennukleosomen und Rattennukleosomen sind nach allen bekannten Daten über diese Strukturen identisch.

Woraus bestehen die Nukleosomen genau?

Nach allem was wir über Nukleosomen heute wissen bestehen sie zu gleichen Teilen aus Histonproteinen und aus DNA. Die den Proteinkern der Nukleosomen aufbauenden Histonproteine sind die Histone H2A, H2B, H3 und H4, die einen stöchiometrischen Komplex bilden, in dem alle diese Histone genau zweimal auftreten, Es ist naheliegend, aus der Stöchiometrie auf eine Symmetrie der Teilchen zu schließen. Es gibt Hinweise auf eine zweizählige Symmetrieachse⁴. (Bild 4)

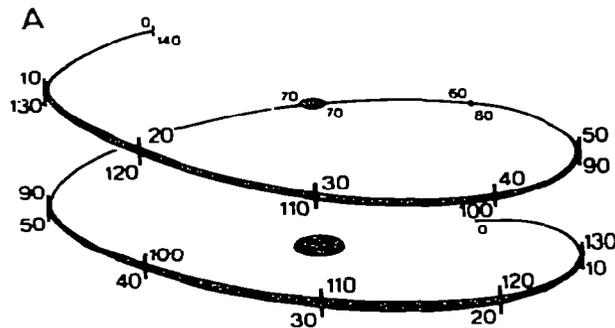


Abb. 4 Schematischer Verlauf der DNA nach Finch and Klug.

Es gibt auch Hinweise auf Halbnukleosomen, aber das ist alles was man in diesem Zusammenhang sagen kann. Die sogenannten inneren Histone bilden unter bestimmten Bedingungen, z.B. in 2M Kochsalzlösung stabile Aggregate, die

sich aber nicht mit DNA zu Nukleosomen assoziieren. Erst wenn man die Gesamtionenstärke erniedrigt, läßt sich ein stabiles Teilchen bilden. Auf diese Weise hat man Zugang zu einem standardisierten Teilchen, das u.U. durch Mikrokoccus Nuklease-Verdauung von Zellkernen nicht so einfach zu erhalten ist ⁵. Diese Rekonstituion erlaubt es eben auch, modifizierte Histone einzuführen. Die DNA in den Nukleosomen besteht immer aus 142 - 145 Basenpaaren. Dies ist eine feste Zahl, die für alle bisher untersuchte Nukleosomen gilt. Die Zahl der Basenpaare ist auch unbeeinflußt von der relativen Häufigkeit der GC- und AT Basenpaare und auch davon, ob die DNA in ihrer Vorgeschichte jemals Histone gesehen hat. Die Bakterien und Viren, kurz alle Prokaryonten, besitzen von Natur aus keine mit der DNA assoziierten Proteine. Trotzdem lassen sich aus DNA der E.coli und Histonen aus Kalbsthymus rekonstituierte Nukleosomen darstellen. Die Wechselwirkung der DNA mit den inneren Histonen kann also nicht basenspezifisch sein. Worin besteht die Grundlage der Wechselwirkungen der Histone mit der DNA. Einen wichtigen Hinweis auf die überwiegende Art der Wechselwirkungen erhält man, wenn man sich die Primärstruktur der Histone ansieht. Augenfällig ist die Häufung der positiv geladenen Aminosäuren. Lysin bzw. Arginin sind von allen Aminosäuren die am häufigsten vertretenen. Wenn man sich die bekannten Primärstrukturen der vier Histone ansieht, (Bild 5) dann fällt die hohe Frequenz

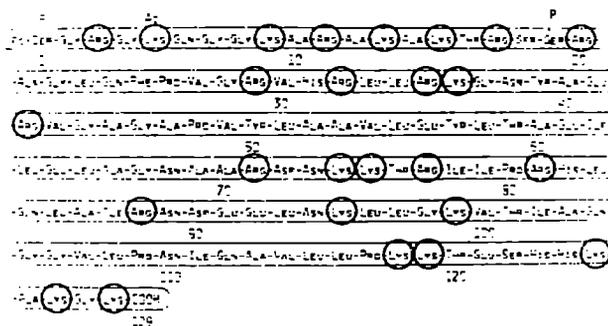


Abb. 5 Primärstruktur des Histons H2A.

der protonierten Aminosäuren auf. Im Schnitt trägt jede 4. Aminosäure eine positive Ladung in der Seitengruppe. Die Ladungsverteilung entlang der Polypeptidkette ist aber nicht rein statistisch, sondern läßt an ein Teilchen denken, das in seiner Sekundärstruktur einen globulären Kern bildet, aus dem der N-terminale und der C-terminale Schwanz sozusagen heraushängen. Hier häufen sich die Ladungen und es liegt nahe, eine bevorzugte Wechselwirkung zwischen den geladenen Aminosäuren und den entgegengesetzt geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren anzuordnen. Daß diese Ionenwechselwirkungen zwischen den Nukleinsäuren und den Histonen einen wichtigen Beitrag für die Stabilität der Nukleosomen bilden, läßt sich schon dadurch zeigen, daß man durch die Erhöhung der Kationen in der Lösung die Stabilität der geordneten Strukturen leicht beeinflussen kann.

Es lohnt sich glaube ich, noch ein paar Worte zu den van der Waals Wechselwirkungen und den Wasserstoffbrückenbindungen zu sagen. Wir sind uns glaube ich nicht immer bewußt, daß auch diese beiden Wechselwirkungen auf elektrostatische Effekte zurückzuführen sind, nur ist die Ladungstrennung hier zeitlich und räumlich nicht konstant, sondern wird erst durch die gegenseitige Annäherung der Atome hervorgerufen. Bei den van der Waals Wechselwirkungen ist die Bindungsenergie umgekehrt proportional zur 6. Potenz der Entfernung. Zu der anziehenden Wechselwirkung kommt noch die van der Waals'sche Abstoßung, hervorgerufen durch den Kontakt der äußeren Elektronenschalen. Die verschiedenen van der Waals Wechselwirkungen gleich sich bei einer bestimmten Entfernung der Atome gerade aus. Diese Entfernung nennen wir den van der Waals Radius. Die Größenordnung der Wechselwirkungsenthalpie solcher van der Waals Wechselwirkungen ist etwa 1 kcal/M. Verglichen mit den 0,6 kcal/M für die mittlere kinetische Energie heißt das: unter physiologischen Bedingungen spielen van der Waals Wechselwirkungen nur dann eine Rolle, wenn spezielle Molekülgruppierungen geeignete Kontaktflächen

für andere Molekülgruppierungen bilden ⁶. Daraus ergibt sich eine allgemeine Regel, daß in einem biologischen System die meisten Moleküle nur mit wenigen anderen Molekülen solche Kontaktflächen und damit die Fähigkeit zur Ausbildung von van der Waals Wechselwirkung gemeinsam haben. Hier kommt nämlich noch hinzu, daß ja auch noch das Solvatwasser, das unsere Moleküle umgibt, dabei zu berücksichtigen ist, d.h. es muß gleichzeitig in der Lage sein, eine möglichst geordnete Struktur auszubilden. Diese starke Tendenz des Wassers, unpolare Gruppen auszuschließen zusammen mit der Tendenz der unpolaren Gruppen, van der Waals Wechselwirkungen einzugehen, wird in der Literatur häufig unter dem gemeinsamen Etikett hydrophobe Wechselwirkungen zusammengefaßt.

Wir wollen uns hier aber nicht weiter in den Nomenklaturstreit einlassen, was eine hydrophobe Wechselwirkung ist, wir wollen nur so viel aus der Erörterung mitnehmen, daß die Wechselwirkung unpolarer Gruppen untereinander zusätzlich dadurch beeinflußt ist, ob das Lösungsmittel Wasser dabei eine geordnete Struktur ausbilden kann. Das Lösungsmittel Wasser spielt vor allem für die letzte Gruppe der schwachen Wechselwirkungen eine Rolle, die H-Brückenbindungen. Wenn hier von der H-Brückenbindungsenergie gesprochen wird, dann ist damit grundsätzlich die Differenz der H-Brückenenergie der zwei Moleküle untereinander und der Moleküle mit dem Wasser gemeint. Auch Wasserstoffbrückenbindungen sind letztlich elektrostatischer Natur. Als anschauliches Beispiel sei hier nur an die Wechselwirkung einer $(\text{NH}_3)^+$ -Gruppe mit einer COO^- -Gruppe erinnert. Der Übergang zwischen Ionenbindung und H-Brückenbindung ist also fließend. In biologischen Systemen sind die Wasserstoffbrückenbindungen die mit Abstand wichtigste Gruppe der schwachen Wechselwirkungen, da sie stärker als van der Waals Wechselwirkungen und vor allem stärker ausgerichtet als van der Waals Bindungen sind. Wasserstoffbrückenbindungen sind die Grundlage der meisten spezifischen Wechselwirkungen. Der genetische Code basiert, wie

wir noch genauer sehen werden, vor allem auf der Zahl der zwischen zwei Nukleobasen ausgebildeten Wasserstoffbrücken. AT-Basenpaare haben in der Ebene der heterozyklischen Ringe 2 H-Brücken und GC-Basenpaare haben 3 H-Brücken.

Woher weiß man, daß die rekonstituierten Partikel und die Produkte aus der Nukleasespaltung des Chromatins identisch sind? Die Antwort auf diese Frage ist gleichzeitig die Antwort auf die Frage, ob man an diesen Partikeln etwas messen kann, das über die Funktion und Struktur etwas aussagt.

Aussagen über die Struktur von Proteinen, vor allem aber von Nukleinsäuren lassen sich mit Hilfe von zwei optischen Parametern gewinnen, nämlich mit Hilfe des Circulardichroismus und mit Hilfe der Absorption als Funktion der Wellenlänge.

Die CD Kurve der DNA ⁷ geht bei 273 nm durch ein Maximum, anschließend durch ein Minimum bei 246 nm und bei 223 nm ist die Elliptizität der DNA vernachlässigbar klein. Das Summenspektrum der Nukleotide hat qualitativ den gleichen Verlauf ist aber in seiner Intensität um den Faktor 10 kleiner. Das CD Spektrum der Nukleosomen unterscheidet sich charakteristisch vom Spektrum der DNA. Das CD Spektrum der Nukleosomen geht durch ein Faktor 10 tieferes Minimum bei 223 nm. Das läßt sich günstig ausnutzen, wenn man die DNA und die Histone getrennt beobachten will. Beobachtet man bei 273 nm sieht man überwiegend die DNA, beobachtet man bei 223 nm, sieht man überwiegend die Histone.

Beobachtet man die Absorption von UV-Licht als Funktion der Wellenlänge, so erhält man ebenfalls für Nukleinsäuren ein charakteristisches Spektrum ⁸, das als Information die Zusammensetzung und den Ordnungszustand erhält. Den Ordnungszustand erhält man durch den Vergleich mit dem Spektrum der die Nukleinsäure aufbauenden Nukleotide. Ihre Absorption ist bei gleicher molarer Konzentration nämlich etwa 40% größer als die Absorption der doppel-

helikalen Struktur der DNA z.B.. Dieses Phänomen nennt man Hyperchromizität. Die Hyperchromizität ist ein geeignetes Mittel, um den Ordnungszustand der DNA in den Nukleosomen als Funktion der Temperatur zu verfolgen. Noch informativer ist die Änderung der Hyperchromizität als Funktion der Temperatur, da man aus der Änderung dieser Größe die Reaktionsenthalpie für den Übergang einer kooperativen Einheit vom geordneten in den ungeordneten Zustand verfolgen kann.

Auf dem folgenden Bild (Bild 6) ist die Änderung der

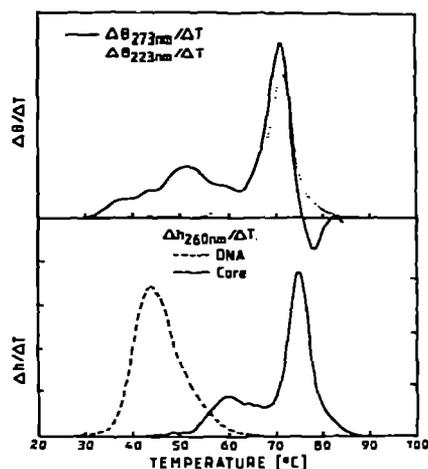


Abb. 6 Änderung der Elliptizität (obere Kurve) und der Hyperchromizität (untere Kurve) als Funktion der Temperatur.

molaren Elliptizität in einem Intervall $d\theta/dT$ als Funktion der Temperatur bei zwei verschiedenen Wellenlängen des eingestrahlten Lichts aufgetragen. Die gestrichelte Linie gibt den Verlauf für die DNA-Fraktion wieder. Man erkennt zwei Temperaturintervalle, nämlich den Temperaturbereich bis 60°C und den Temperaturbereich um 70°C. Die gepunktete Linie spiegelt den Verlauf der Änderung der Elliptizität des Histonkerns als Funktion der Temperatur wieder. Die Hauptänderung für die DNA und für die Histone fällt zusammen. Die Änderung im ersten Teil ist

umkehrbar. Wenn sich aber auch die Struktur des Proteins ändert, führt die thermische Denaturierung zu einer nicht mehr umkehrbaren Veränderung der Nukleosomen. Qualitativ wird der gleiche Verlauf der Strukturumwandlung der DNA auch im unteren Teil des Bildes wiedergegeben. Die bei 260 nm registrierte Änderung der Hyperchromizität als Funktion der Temperatur läßt sich ebenfalls als Aneinanderreihung zweier Prozesse interpretieren. Etwa 25% der Änderung der DNA - Struktur erfolgt bei 60°C und die übrigen 75% der Änderung erfolgen bei etwa 75°C. Zum Vergleich ist noch der Peak eingezeichnet, den man bei der thermischen Denaturierung der isolierten DNA-Doppelhelix mit einer Länge von 142 B.P. erhält. Hier ist die Temperatur, bei der gerade 50% der Sekundärstruktur verändert sind, etwa 16° niedriger als der Vorpeak der Nukleosomenumlagerung und ca. 30° niedriger als der Hauptpeak der Nukleosomendenaturierung.

Wie lassen sich die einzelnen Schritte der Denaturierung der Untereinheiten darstellen. Das kompakte native Partikel beginnt wie ein Paket, sich mit steigender Temperatur aufzupacken. Zuerst entwindet sich die außen herumgeschlungene DNA. Treiben wir es nicht zu weit mit der Temperaturerhöhung, dann läßt sich das Teilchen wieder sauber einpacken. Das gelingt deshalb so gut, weil die Helixbildung ebenfalls ein kooperativer Prozess ist, der bevorzugt an einer Keimbildungsstelle einsetzt. Die intakte DNA ist der Keim und das jeweils am nächsten benachbarte Basenpaar bildet sich spontan aus. Es wird einmal über Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten. Darüber hinaus erfolgt eine zusätzliche Stabilisierung durch die Stapelwechselwirkung mit dem vorausgegangenen Basenpaar. Natürlich können die Basen an den Enden der Einzelstränge ebenfalls Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Aber ihnen ist die Stapelwechselwirkung verwehrt. Packen wir unser Teilchen durch Temperaturerhöhung aus, dann erhalten wir etwas Unübersichtliches. Die beiden getrennten, als

statistisches Fadenknäuel vorliegenden Nukleinsäurestränge werden mit den Histonen, die noch über die elektrostatischen Wechselwirkungen an dem Zucker-Phosphat Rückgrat der Nukleinsäuren hängen, verbunden, die einzelnen Histone bilden aber keine gemeinschaftliche Struktur mehr. Die Analyse der Teilchen in der Ultrazentrifuge zeigt keine Veränderung der Teilchengröße bei der Denaturierung. Es bleibt das Teilchengewicht der nativen Nukleosomen erhalten, aber die Änderung der Elliptizität mit der Temperatur signalisiert einen weitgehenden Verlust der geordneten Konformation. Eine Temperaturerniedrigung führt nicht mehr zu einem geordneten Histon-DNA-Komplex. Qualitativ ist uns die thermische Denaturierung wie man sie mit der optischen Methode verfolgen kann, glaube ich, plausibel.

Läßt sich auch quantitativ dazu etwas sagen? Wir sind ja hier angetreten mit der optimistischen Vorstellung, daß man die thermodynamischen Parameter dieser Denaturierung und damit auch der Bildung der Nukleosomen ermitteln kann. Auf dem folgenden Bild ist das Privalov-Kalorimeter im demontiertem Zustand dargestellt.⁹ (Bild 7)

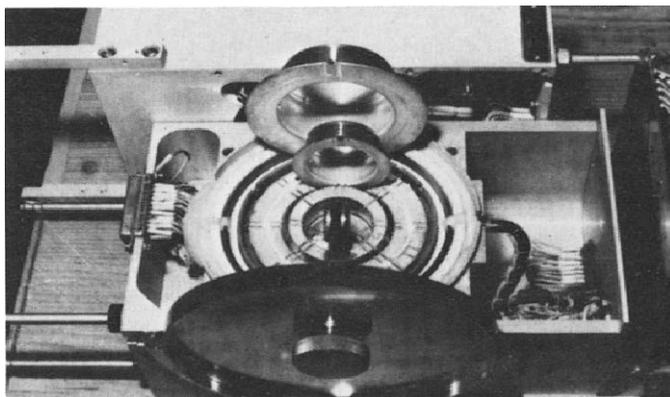


Abb. 7 Einblick in den Zellenblock des Privalov-Kalorimeters.

Die flachen, dosenförmigen Behälter sind die Meß- bzw. Referenzzelle. Beide Zellen werden von dem gleichen Strom geheizt, die elektrischen Heizelemente sind auf die flache Seite der Zellen aufgeklebt. Zwischen den Zellen befindet sich eine Differentialthermosäule, die die Temperaturunterschiede zwischen den beiden Zellen auf 10^{-4} Grad erfaßt. Die Regelung der Heizung erfolgt so, daß die Temperaturdifferenz möglichst konstant und klein ist. Tritt jetzt im Verlauf einer regelmäßigen Temperaturerhöhung bei der den Zellen in der Meßzelle eine Strukturänderung der gelösten biologischen Substanz ein, so führt der endotherme Effekt zu einer Verringerung des Temperaturanstiegs in der Meßzelle. Der Regler bekommt das Differenzsignal der Thermosäule und erhöht hierauf die Heizspannung in der Meßzelle und erniedrigt die Heizspannung in der Vergleichszelle um den gleichen Betrag und zwar so lange bis sich die Temperaturdifferenz unter die Erfassungsgrenze erniedrigt hat. Der Schreiber registriert diese Zusatzheizleistung als Funktion der Zeit, und da die Temperaturerhöhung zeitlinear erfolgt, als Funktion der Temperatur. Das Integral über die Fläche ist die Umwandlungsenthalpie. Die Division durch die Konzentration des gelösten Stoffes ergibt die pro stöchiometrischer Einheit aufgewendete Umwandlungsenthalpie. Messen wir die der thermischen Denaturierung der Nukleosomen zugeordnete Enthalpieänderung in einem solchen Kalorimeter, dann erhalten wir die folgende Kurve. (Bild 8)

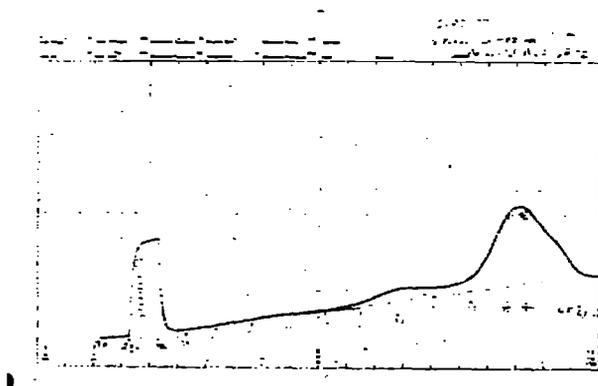


Abb. 8 Originalmeßkurve der Denaturierung von Nukleosomen.

Dies ist eine original Meßkurve. Zusätzlich zur Meßkurve der Nukleosomendenaturierung sehen sie noch den elektrischen Eichpeak. 240 Sek. lang werden 50 μ Watt zugeführt, d.h. der gesamte Eichpeak entspricht 28 mcal. Der gesamte Meßpeak entspricht 6,26 mcal. Die Messung wurde mit 0,5 mg DNA oder $7,6 \cdot 10^{-7}$ Mol Basenpaaren durchgeführt. Die kalorimetrische Meßkurve stimmt in ihren Verlauf sehr gut mit der UV optisch gemessenen Denaturierungskurve überein. Wir haben wieder einen Hauptpeak und einen Vorpeak, und wir können die Information aus der optischen Kurve bezüglich der Konformationsumwandlung der DNA und des Protein/DNA-Komplexes verwenden, um eine Separierung der Energieaufwendung für die Denaturierung der Einzelkomponenten durchzuführen. Die Fläche des Vorpeaks repräsentiert 26% der Gesamtfläche. Diese Energie wird allein zur Denaturierung der DNA an den Enden der 142 B.P. langen Helix benötigt. Es handelt sich hierbei um 38 B.P.. Von den $1 \frac{3}{4}$ Windungen der DNA bleibt also ungefähr eine volle Windung in der hochgeordneten Konformation und eng an die nativen inneren Histone gebunden. Die Denaturierung dieses Teils der DNA-Doppelhelix ist vollständig umkehrbar. Erst durch weitere Temperaturerhöhung tritt die Denaturierung der gesamten Struktur ein. Die Berechnung der Umwandlungsenthalpie der DNA, die der Hauptumwandlung zuzuordnen ist, wird natürlich durch die gleichzeitige Denaturierung des Histonkerns erschwert. (Bild 9)

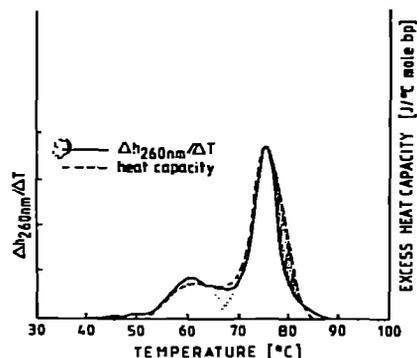


Abb. 9 Vergleich der Enthalpieänderung und der Hyperchromizitätsänderung.

Vergleichen wir die bei 260 nm registrierte Änderung der Hyperchromizität mit der Wärmekapazitäts/Temperaturfunktion im gleichen Temperaturintervall sehr sorgfältig, so sehen wir, daß die optisch gemessene Denaturierungskurve symmetrisch verläuft, während die kalorimetrisch gemessene Umwandlungskurve auf der Seite oberhalb der Halbumwandlungstemperatur einen Zusatzbeitrag enthält, der wohl der Proteindenaturierung zuzuordnen ist. Dadurch sehen wir uns leider gezwungen anstatt einer eindeutigen Aussage über die Größe der Umwandlungsenthalpie der DNA des Hauptpeaks zwei Grenzfälle diskutieren zu müssen.

Nehmen wir einmal an, daß die Histondenaturierung nur einen vernachlässigbar kleinen Beitrag zur Gesamtumwandlungsenthalpie liefert, dann ergibt sich für die DNA ein Betrag von 12,2 kcal/MBP. Vergleichen wir diesen Wert mit der Umwandlungsenthalpie nativer DNA aus Kükenblut, so scheint uns der Wert für die Nukleosomen DNA zu hoch. Vergleichen wir den Wert aber nicht mit den Ergebnissen für freie DNA, sondern mit dem Wert für die DNA in einem Poly-L-Lysin-DNA Komplex, der mit den gleichen experimentellen Techniken wie hier untersucht worden ist, dann erhalten wir für die DNA bei einem Phosphat/Lysin Verhältnis von 1 : 0,6 ebenfalls 12,2 kcal/MBP. Dieser Vergleich stützt also unser Ergebnis für die Umwandlungsenthalpie der DNA in Nukleosomen. Der Wert 12,2 kcal/MBP ist aber zweifellos ein Maximalwert. Diskutieren wir kurz den Alternativfall, dann sieht die Situation etwas anders aus. Die DNA ist nicht durch die Bindung an die Histone zusätzlich stabilisiert, d.h. die Umwandlungsenthalpie entspricht genau dem Wert für freie DNA nämlich 7,5 kcal pro Mol Basenpaar, dann läßt sich aus der Zusatzfläche des Hauptpeaks eine Denaturierungsenthalpie von ca. 120 kcal/Mol Histonkomplex ausrechnen. Welchen molekularen Strukturänderung der Histone dieser Betrag zuzuordnen ist, läßt sich aufgrund der kalorimetrischen Messungen nicht entscheiden. In der Tabelle sind die thermodynamischen Daten noch einmal zusammengefaßt.

Tabelle I

Experimentelle Werte für die Denaturierung der DNA
in Nukleosomen.

	T_m	ΔH	ΔS	ΔG^0	ΔH_{vH}
Werte für	$^{\circ}C$	kcal/MBP	cal/grd MBP	kcal/MBP	kcal/MBP
isolierte DNA	45,5	6,6	20,6	0,45	81
freie DNA in Nukleos.	61,0	7,5	22,4	0,84	106
gebundene DNA in Nukl.	76,0	12,2	34,8	1,79	128

Es ist nur der erste Fall unserer alternativen Diskussion der Hauptumwandlung berücksichtigt, weil er der wahrscheinlichere ist. Wie sie sehen, lassen sich durchaus thermodynamische Parameter für die Denaturierung von geordneten Chromatin-Untereinheiten ermitteln und einzelnen Beiträgen in unser Modell der thermischen Denaturierung der Nukleosomen zuordnen.

Literatur

1. A.L.Olins und D.E.Olins, Science, 183, (1974) 330
2. K.Tatchell und K.E.Van Holde, Proc.Natl.Acad.Sci, 75, (1978) 3583
3. W.Weischet, K.Tatchell, K.E.Van Holde und H.Klump, Nucl.Acid Res., 5, (1978) 139
4. H.Weintraub und F.Van Lente, Proc.Natl.Acad.Sci., 71, (1974) 4249

5. H.Noll, J.Thomas und R.Kornberg, *Science*, 187, (1975) 1203
6. W.Kauzmann, *Adv.Prot.Chem.*, 14, (1959) 1
7. H.Li in *Chromatin and Chromosome Structure* (H.Li und R.Eckhard ed.) (1977) A.P. New York
8. V.Bloomfield, D.Crothers und I.Tinoco, *Physical Chem. of Nucl.Acids* (1974)
9. V.Filimonov und P.Privalov, *J.M.B.*, 122, (1978) 465