

Untersuchung der longitudinalen Kernspinrelaxation in konzentrierten Lösungen von Heringsspermien – DNA zur Frage des an DNA gebundenen Wassers* + §

Spin-Lattice Relaxation in Concentrated Solutions of Herring-Sperm DNA
and the Problem of Water Bound to DNA

A. DANIELS

Institut für Biophysik der Ruhr-Universität Bochum

(Z. Naturforsch. 28c, 136–143 [1973]; eingegangen am 13. September/15. Dezember 1972).

Nuclear magnetic resonance (NMR), spin-lattice relaxation, deoxyribonucleic acid (DNA),
bound water, proton exchange

Proton and Deuteron spin — lattice relaxation have been measured in aqueous solutions of herring sperm DNA as a function of concentration, temperature, and NMR frequency. We find a minimum if the increment of the relaxation rates, $1/T_1 - 1/T_1$ (free solvent) is plotted as a function of the inverse temperature. The result can be understood by assuming a superposition of two exchange processes: a very rapid exchange of water molecules causes the rate increment at lower temperatures whereas the frequency dependent rate increment in the high temperature region is caused by slow exchange of bound water molecules or DNA protons. The correlation time or the exchange time of the fast exchanging water molecules is smaller than 10^{-8} s at 4 °C with an activation energy of 7.2 kcal/mole, whereas the slowly exchanging water molecules or DNA protons have at the same temperature a correlation time of more than 10^{-7} s with an activation energy of 9.8 kcal/mole and an exchange time of 1 s with an activation energy of 11.5 kcal/mole.

Einführung

Die Eigenschaften des an DNA in wässriger Lösung gebundenen Wassers können mit den verschiedenen physikalisch-chemischen Meßmethoden jeweils nur indirekt erfaßt werden, so daß ein Vergleich der Meßresultate oft zu scheinbaren Widersprüchen führt (TUNIS und HEARST¹). Messungen der longitudinalen und transversalen Kernspinrelaxationszeiten T_1 und T_2 ermöglichen eine Aussage über die gebundenen Wassermoleküle, deren Korrelationszeit der Brown'schen Molekularbewegung wesentlich länger als die der freien Wassermoleküle ist. Solche Messungen wurden bereits von LUBAS und WILCZOK² und von SPRINZ, DÖLLSTÄDT und HÜBNER³ durchgeführt. Durch Vergleich von T_1 - und T_2 -Messungen erhalten LUBAS und WILCZOK² eine Abschätzung von Anzahl und Korre-

lationszeit der gebundenen Wassermoleküle. Da die so gefundenen Korrelationszeiten in der Größenordnung von 10^{-8} s liegen, lag es nahe, T_1 in Abhängigkeit von der Larmorfrequenz zu messen (Noack⁴). Aus der Frequenzabhängigkeit der Relaxationsrate sollte es so möglich sein, die Korrelationszeiten direkt zu bestimmen.

Material

Als DNA diente Heringsspermien-DNA, die nach ZAHN⁵ präpariert war. Die Herstellung der Probenrörchen für die Kernresonanzuntersuchung besorgte Herr Professor ZAHN, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Mainz. Das hier verwendete Präparat ist bei B. HEICKE⁶ beschrieben. Die analytischen Daten geben wir in Tab. I wieder. Die trockene DNA

Tab. I. Analytische Daten der verwendeten Heringsspermien-DNA nach HEICKE⁶, dort Tabn. I und VI.

Wassergehalt	13,3 %
RNA-Gehalt	0,86% des Trockengewichts
Proteingehalt	0,94% des Trockengewichts
Stickstoffgehalt	15,79% des Trockengewichts
Phosphorgehalt	9,33% des Trockengewichts
Molares N/P-Verhältnis	3,74
P	6,058
Hyperchromer Effekt	49,20%
„intrinsic viscosity“	56 dl/g
Molekulargewicht	$2,2 \cdot 10^7$

Sonderdruckanforderung an Dr. A. DANIELS, Institut für Biophysik, D-4630 Bochum, Postfach 2148, Buscheystr.

* Kurzfassung der Dissertation Frankfurt 1971.

+ Die Experimente zu dieser Arbeit wurden teilweise am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt/Main durchgeführt.

§ Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Forschungsvorhabens „Untersuchung der Eigenschaften von an Makromolekülen gebundenem Wasser“ unterstützt.



wurde direkt in die Probenröhren eingewogen und auf 0,5 ml mit Pufferlösung (0,15 M NaCl, 0,01 M Tris-Puffer, pH 7,0) aufgefüllt. Nach 10 min Wirbeln in einem „Whirlmix“ blieben die Proben 8 Tage lang bei Zimmertemperatur stehen, um eine gleichmäßige Durchfeuchtung der DNA zu erreichen. Danach waren wegen der großen Viskosität dieser Lösungen einige Luftblasen in den Röhrchen hängen geblieben; diese wurden entfernt, indem 60 min lang bei 2000xg flotierend zentrifugiert wurde. Durch abwechselndes Evakuieren und Herstellen reiner Stickstoffatmosphäre wurde der Sauerstoff weitgehend entfernt, und die Probenröhren wurden in Stickstoffatmosphäre abgeschmolzen. In der gleichen Weise wurden zu einem späteren Zeitpunkt aus derselben DNA-Charge D₂O-Lösungen hergestellt. Die DNA-Konzentrationen betrugen 3, 30, 60 und 100 mg DNA/ml H₂O. Von DNA-Proben mit 60 bzw. 100 mg/ml wurde im Anschluß an die Kernresonanzmessung der Schwermetallgehalt durch Neutronenaktivierungsanalyse festgestellt. Diese Messungen führten freundlicherweise die Herren Dr. Samsahl und Dr. Schramel von der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München, durch. Die Ergebnisse sind für die konzentriertesten Lösung in Tab. II wiedergegeben.

Tab. II. Gehalt an Schwermetallen in den DNA-Proben mit 100 mg DNA/ml H₂O.

Metall	N_S [cm ⁻³]	Anzahl der Basenpaare pro Metallion
Mn	$0,78 \cdot 10^{14}$	$1,3 \cdot 10^6$
Ni	$0,86 \cdot 10^{17}$	$1,2 \cdot 10^8$
Cu	$0,43 \cdot 10^{15}$	$2,3 \cdot 10^5$
Cr	$0,35 \cdot 10^{14}$	$3,4 \cdot 10^6$
Co	$0,46 \cdot 10^{14}$	$2,2 \cdot 10^6$
Fe	$0,99 \cdot 10^{17}$	$1,05 \cdot 10^8$

* N_S = Anzahl der Ionen pro Volumen in der konzentriertesten DNA-Lösung.

Um den Einfluß der Eisenionen auf die Relaxationsrate in Abhängigkeit von der Temperatur zu ermitteln, wurden außerdem 8 Proben mit verschiedenen Konzentrationen von FeCl₃ und einer DNA-Konzentration von je 0,8 mg/ml und 5 Proben ohne DNA, ebenfalls mit verschiedenen FeCl₃-Konzentrationen, hergestellt.

Meßmethode

Die Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit T_1 erfolgte mit einem kommerziellen Spin-Echo Gerät B-KR 304 s der Firma Bruker Physik AG. Durch eine Sättigungsfolge von 90°-Pulsen (Pulslänge ca. 3 μs bei einer Sendefrequenz von 60 MHz, Pulsabstand zwischen 40 und 400 μs) wird erreicht, daß als Anfangsbedingung die Magnetisierung $M = 0$ ist. Nach der Zeit t wird die durch Relaxation wieder erreichte

Magnetisierung durch einen einzelnen 90°-Puls abgefragt. Die Auswertung erfolgte sowohl graphisch, indem $M(\infty) - M(t)$ halblogarithmisch gegen t aufgetragen wurde, als auch mit Hilfe eines Rechnerprogramms, indem $\ln(M(\infty) - M(t))$ in Abhängigkeit von t nach der Methode der kleinsten Quadrate durch eine Gerade angenähert wurde. Beide Auswerteverfahren ergaben im Rahmen der Meßgenauigkeit äquivalente Ergebnisse. Die schlechtest reproduzierten Meßpunkte zeigten in H₂O eine Fehlerbreite von ± 30%, in D₂O von ± 50%, im Durchschnitt lagen die Fehlerbreiten bei ± 1 bis ± 20% bzw. ± 2 bis ± 30%. Die Relaxationszeiten wurden in Abhängigkeit von der Temperatur in den H₂O-Lösungen bei den vier uns zur Verfügung stehenden Meßfrequenzen 6, 15, 30 und 60 MHz, bei den D₂O-Lösungen bei 6 MHz gemessen. Die Temperatur war während der Messung auf 0,1 °C konstant. Die Temperaturänderung erfolgte bei den H₂O-Lösungen bei jeder Meßfrequenz von neuem. Die Meßwerte bei 60 und 15 MHz wurden nach diesem viermaligen Erwärmern und Abkühlen im Rahmen der Meßgenauigkeit reproduziert.

Ergebnisse und Interpretation

Für alle Proben ergab sich bei allen Temperaturen im Rahmen der Meßgenauigkeit eine exponentielle Relaxation, was in Abb. 1 für die konzentriertesten

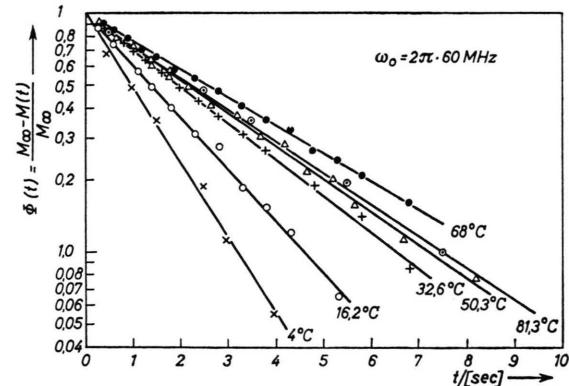


Abb. 1. Normierte Relaxationsfunktion der DNA-Lösung mit $c = 100$ mg DNA/ml H₂O bei der Meßfrequenz 60 MHz bei verschiedenen Temperaturen.

DNA-Lösungen bei der Meßfrequenz 60 MHz dargestellt ist. Die Relaxationsrate hängt bis zur Konzentration 60 mg/ml linear von der Konzentration ab. Da die Abweichung der Meßwerte bei der höchsten Konzentration vom linearen Zusammenhang keine systematische Temperatur- und Frequenzabhängigkeit erkennen ließ, wurden diese Werte bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Die Konzentrations-

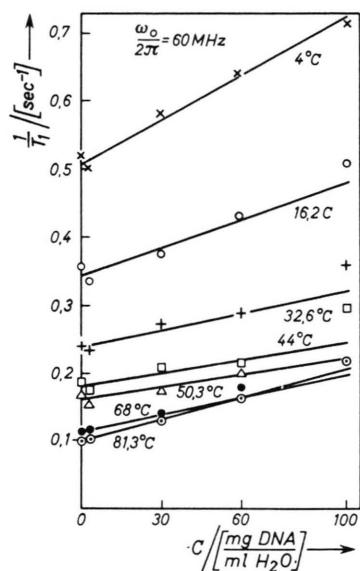


Abb. 2. Relaxationsrate $1/T_1$ in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration bei verschiedenen Temperaturen, Meßfrequenz 60 MHz.

abhängigkeit ist in Abb. 2 für verschiedene Temperaturen bei der Meßfrequenz 60 MHz dargestellt. Wir definieren den Relaxationsratenzuwachs $\Delta (1/T_1)$ für die Konzentration c

$$\Delta \frac{1}{T_1} = \left(\frac{1}{T_1} \right)_c - \left(\frac{1}{T_1} \right)_{c=0} = k_1 \cdot c, \quad (1)$$

wobei k_1 die Steigung der in Abb. 2 dargestellten Geraden bezeichnet. Abb. 3 zeigt diesen Relaxations-

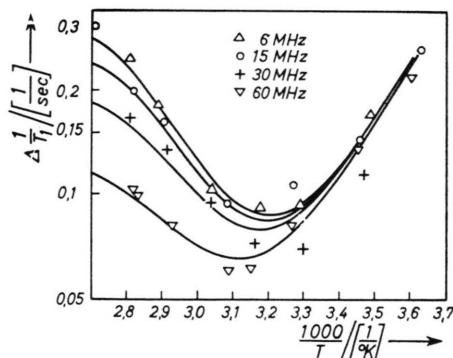


Abb. 3 Relaxationsratenzuwachs $\Delta 1/T_1$ für vier verschiedene Larmorfrequenzen in Abhängigkeit von $1000/T$. Kurven nach Gl. (5) mit (6) und (9), Parameter nach Tab. III mit $x_B = 0,003$.

ratenzuwachs in Abhängigkeit von $1000/T$ bei den vier Meßfrequenzen. k_1 wurde hierfür aus Abb. 2 entnommen, c ist willkürlich = 100 mg/ml gesetzt.

Abb. 4 zeigt das entsprechende Ergebnis, das an den D₂O-Lösungen erhalten wurde.

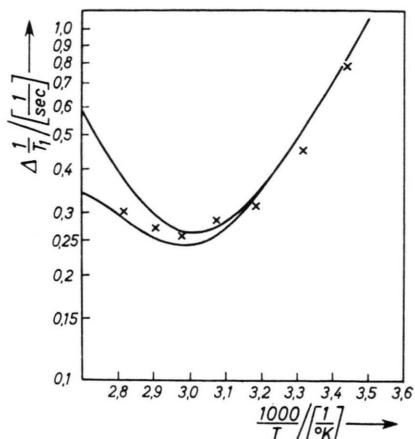


Abb. 4. Relaxationsratenzuwachs $\Delta 1/T_1$ in DNA-Lösung in D₂O. Kurven nach Gl. (5) mit (6) und (9), obere Kurve mit der Konstanten nach Gl. (13), untere nach Gl. (14).

Zur Deutung der Messungen verwenden wir das Modell von ZIMMERMANN und BRITTIN⁷ (im folgenden ZB), das die Relaxation eines Mehrphasensystems bei chemischem Austausch oder beim Austausch ganzer Moleküle beschreibt. Phasen im Sinn dieser Theorie sind Protonen in verschiedenen Bindungszuständen. Phasen, zwischen denen der Austausch so schnell erfolgt, daß die Korrelationsfunktion der Dipol-Dipol-Wechselwirkung vom Austausch beeinflußt wird (BECKERT und PFEIFER⁸, SILLESCU und BRÜSSAU, SILLESCU⁹), sind im Sinn der Theorie von ZB als eine Phase anzusehen. Wir unterscheiden in der DNA-Lösung sieben Klassen von Protonen:

- Den Hauptbestandteil bilden die Wasserprotonen der frei beweglichen Wassermoleküle, zu denen wir auch die Wassermoleküle zählen, die an freien Na⁺- und Cl⁻-Ionen gebunden sind, da diese erst bei sehr viel größeren NaCl-Konzentrationen merklich zur Relaxationsrate beitragen (HERTZ und ZEIDLER¹⁰).
- Protonen, die sich in gebundenen Wassermolekülen befinden. Nach den Untersuchungen von FALK, HARTMANN und LORD¹¹ und LEWIN¹² sollte man die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß diese Wassermoleküle keine einheitliche Relaxationszeit haben, da sehr verschieden stark gebundene Wassermoleküle vorkommen.
- DNA-Protonen, die im Watson-Crick Modell aus der Doppelhelix in die große und kleine Furche herausragen, also Aminoprotonen, die nicht in der Doppelhelix zur Wasserstoffbrückenbindung beitragen.

4. Protonen, die in der Doppelhelix Wasserstoffbrücken bilden.
5. Protonen an aromatischen Ringen der Basen.
6. Protonen der Zuckermoleküle.
7. Protonen in der Hydrathülle von Schwermetallionen.

Wir untersuchen zunächst, ob letztere allein das Meßergebnis erklären können. Ein Vergleich von Tab. II mit den Ergebnissen von EISINGER, SHULMAN und SZYMANSKI¹³ zeigt, daß die Verunreinigung mit Eisen und Nickel geringfügig zur Relaxation beitragen kann. Für die Relaxation der Wassermoleküle in der Hydrathülle dieser Ionen ist als Korrelationszeit der Dipol-Dipol-Wechselwirkung die Elektronenspinrelaxationszeit τ_s maßgebend. Diese ist für Fe^{2+} und Ni^{2+} nach der in ¹³ angegebenen Tab. II wesentlich kleiner als 10^{-11} s, diese Ionen können also auf keinen Fall die Frequenzabhängigkeit bei hohen Temperaturen erklären. Für Fe^{3+} liegt aber $\omega_s \tau_s$ (ω_s = Larmorfrequenz der Elektronenspins) in der Größenordnung von 1, so daß zu untersuchen ist, ob die Frequenzabhängigkeit bei hohen Temperaturen mit der Verunreinigung an Fe^{3+} erklärt werden kann. Wie in ¹³ gezeigt wird, sind Fe^{3+} -Ionen im Inneren der DNA gebunden, es ist also denkbar, daß diese bei hohen Temperaturen in die freie Lösung gehen und dann verstärkt zur Relaxation beitragen. Es müßte dann der bei EISINGER, SHULMAN und SZYMANSKI¹³ definierte „relaxation enhancement factor“ ε bei hohen Temperaturen sich dem Wert 1 nähern. An DNA-Lösungen der Konzentration 0,8 mg/ml mit unterschiedlichen Konzentrationen von FeCl_3 haben wir daher das dort beschriebene Experiment bei vier verschiedenen Temperaturen durchgeführt, das Ergebnis ist in Abb. 5 dargestellt. Für die kleinste Fe^{3+} -Ionenkonzentration von 10^{17} Ionen/ cm^3 ergeben unsere Messungen für ε unabhängig von der Temperatur einen Wert von $0,22 \pm 0,01$. Außerdem zeigt Abb. 6, daß der Beitrag der Fe^{3+} -Ionen zur Relaxation tatsächlich mit zunehmender Temperatur abnimmt, so daß der Wiederanstieg des Ratenzuwachses bei hohen Temperaturen nicht mit der Verunreinigung an Fe^{3+} -Ionen erklärt werden kann. Wollte man den Wiederanstieg mit der Verunreinigung an Schwermetallen erklären, dann sollte der Meßeffekt in der D_2O -Lösung um den Faktor

$$\left(\frac{\gamma_D}{\gamma_H}\right)^2 = \frac{1}{42,4} \quad (2)$$

geringer sein als in H_2O -Lösungen, da der Beitrag zur

Relaxationsrate dann proportional zu γ^2 (γ = magnetogyrisches Verhältnis) ist¹³. In den D_2O -Lösungen wird aber bei hohen Temperaturen ebenfalls ein deutlicher Anstieg des Ratenzuwachses beobachtet. Die

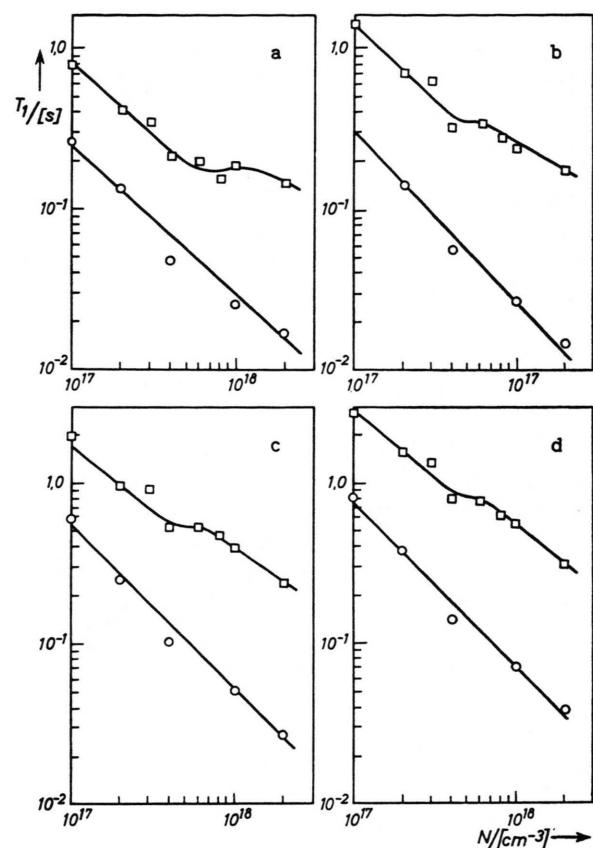


Abb. 5. Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 , in FeCl_3 -Lösungen ohne DNA (○) und mit 0,8 mg/ml DNA (□) in Abhängigkeit von der Fe^{3+} -Ionenkonzentration.
a. 2 °C; b. 25 °C; c. 45 °C; d. 69 °C.

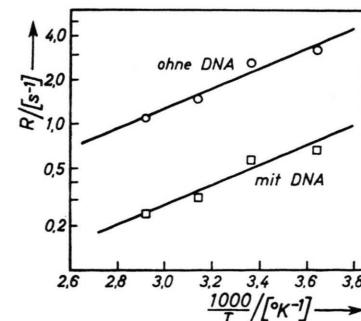


Abb. 6. Rateninkrement $R = 1/T_1 - 1/T_1$ Wasser in der FeCl_3 -Lösung mit 10^{17} Ionen/ cm^3 in Abhängigkeit von $1000/T$; O ohne DNA; □ mit 0,8 mg/ml DNA.

weitere Diskussion wird aber zeigen, daß bei tiefen Temperaturen der Ratenzuwachs in der H₂O-Lösung teilweise durch diese Verunreinigungen bedingt ist.

Im folgenden untersuchen wir den Einfluß der Protonen in den Bindungszuständen 1 bis 6. Im allgemeinsten Fall der Theorie von ZB wäre von diesen als Relaxationsfunktion eine Überlagerung von 6 Exponentialfunktionen zu erwarten. Der Beitrag zur Relaxationsfunktion von langsam austauschenden Protonen kann aber nur beobachtet werden, wenn der Molenbruch dieser Protonen hinreichend groß ist. Der Molenbruch der Basenpaare in der konzentriertesten Lösung beträgt $x_{BP} = 0,003$, da die Protonen der Sorten 4, 5 und 6 aber langsam austauschen verglichen mit der gemessenen Relaxationsrate (PRINTZ und von HIPPEL¹⁴), tragen diese nicht meßbar zur Relaxationsfunktion bei. Diese Überlegung gilt möglicherweise nicht für Protonen der Sorte 3, deren mittlere Aufenthaltsdauer an der DNA nach FRITZSCHE¹⁵ in der Größenordnung von 1 s oder weniger liegt. Lassen wir außerdem die Möglichkeit zu, daß Protonen der Sorte 2 sehr unterschiedlich fest gebunden sind, so haben wir strenggenommen die Theorie von ZB auf ein System von vier Phasen anzuwenden. Mit Hilfe unserer Meßergebnisse wäre es aber nicht möglich, zwischen einem solchen System und einem solchen mit drei Phasen zu unterscheiden. Wir behandeln daher lediglich drei Phasen und müssen es offenlassen, ob zur dritten Phase besonders fest gebundene Wassermoleküle oder DNA-Protonen gehören. Auch im Fall von drei Phasen ist die Lösung der ZB-Gleichungen nicht mehr in algebraischer Form darstellbar. Es ergibt sich aber im Fall kleiner Molenbrüche der Phasen 2 und 3, x_b und x_B , als Relaxationsfunktion in sehr guter Näherung eine Exponentialfunktion mit der Relaxationsrate

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1-x_b-x_B}{T_{1W}} + \frac{x_b}{T_{1B}+\tau_b} + \frac{x_B}{T_{1B}+\tau_B} \quad (3)$$

falls folgende Bedingungen erfüllt sind:

$$x_b, x_B < 0,01; \quad (4a)$$

$$T_{1b}, T_{1B} < 0,01 T_{1W}; \quad (4b)$$

$$\tau_b < 0,01 T_{1b}; \quad (4c)$$

$$\tau_B < 0,01 T_{1W}. \quad (4d)$$

Gleichung (3) stellt eine Verallgemeinerung einer von LUZ und MEIBOOM¹⁶ angegebenen Gleichung dar. Anstelle von Gl. (4c) ist vermutlich die weniger einschränkende Bedingung $\tau_b < 0,01 T_{1W}$ ausreichend, die Übereinstimmung von Gl. (3) mit der Relaxationsrate nach ZB wurde aber nur mit der Bedingung (4c) über-

prüft, da wir aus der Temperaturabhängigkeit des Ratenzuwachses schließen können, daß $\tau_b < T_{1b}$ ist. Mit (3) und (4) ergibt sich also für den Relaxationsratenzuwachs

$$\Delta \frac{1}{T_1} = \frac{x_b}{T_{1b}} + \frac{x_B}{T_{1B}+\tau_b} \quad (5)$$

Wir nehmen vereinfachend an, daß die Relaxationsraten $1/T_{1b}$ und $1/T_{1B}$ durch Rotationsdiffusion gebundener Wassermoleküle bzw. DNA-Protonen bedingt sind, so daß sich für die Frequenzabhängigkeit ergibt:

$$\frac{1}{T_{1b,B}} = C \left[\frac{\tau_{cb,B}}{1+\omega^2\tau_{cb,B}^2} + \frac{4\tau_{cb,B}}{1+4\omega^2\tau_{cb,B}^2} \right] \quad (6)$$

wobei die Konstante C davon abhängt, ob die Relaxation durch Dipol-Dipol- oder durch Quadrupolwechselwirkung verursacht wird. Der erste Fall liegt in der H₂O-Lösung vor, es ist dann

$$C_{DD} = \frac{3}{10} \frac{\hbar^2 \gamma_H^4}{\hbar} \sum_i r_i^{-6} \quad (7)$$

der zweite Fall liegt in der D₂O-Lösung vor, und es ist

$$C_Q = \frac{3}{40} (1+\eta^2) \left(\frac{e^2 q Q}{\hbar} \right)^2 \quad (8)$$

$\hbar = h/2\pi$, h = Planck'sches Wirkungsquantum;

γ = magnetogyrisches Verhältnis;

r_i = Abstände der Nachbarprotonen, im Fall der Wassermoleküle wird $\sum_i r_i^{-6} = b^{-6}$, b = Abstand der Protonen im Wassermolekül;

$e^2 q Q/h$ = Quadrupolwechselwirkungskonstante;

η = Asymmetrieparameter;

(vgl. ABRAGAM¹⁷).

Die Dipol-Dipol-Wechselwirkungskonstante nach Gl. (7) für H₂O-Moleküle berechnen wir mit $b = 1,52$ Å zu

$$C_{DD} = 1,38 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-2} \quad (\text{KRYNICKI}^{18}) \quad (9)$$

Für Aminoprotonen der DNA trägt im wesentlichen nur das Nachbarproton in derselben Aminogruppe zur Dipol-Dipol-Wechselwirkung bei, es ergibt sich so mit $r_1 = 1,68$ Å

$$C_{DD} = 0,77 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-2} \quad (10)$$

Berücksichtigt man aber zusätzlich die Wechselwirkung mit gebundenen Wassermolekülen in den von LEWIN¹² vorgeschlagenen Konfigurationen, so ergeben sich für C_{DD} Werte zwischen 10^{10} und $1,54 \cdot 10^{10}$

s^{-2} , auf jeden Fall also Werte, die dem für Wassermoleküle angenommenen vergleichbar sind. Dagegen können wir annehmen, daß die Quadrupolwechselwirkungskonstanten für D_2O und -ND₂-Gruppen deutlich unterschieden sind. Für -ND₂-Gruppen in DNA ist uns kein Wert für C_Q bekannt, versuchsweise haben wir den von SARASWATI¹⁹ angegebenen Wert für ND₂-CH₂-COOD verwendet und erhalten so

$$C_Q = 0,19 \cdot 10^{11} s^{-2} \quad (11)$$

für Deuterium in der Deuteroaminogruppe. Für D_2O ist

$$C_Q = 0,1566 \cdot 10^{12} s^{-2} \quad (12)$$

(ABRAGAM¹⁷). Die geringfügige Temperaturabhängigkeit der Quadrupolwechselwirkungskonstanten in D_2O , die GLASEL²⁰ angibt, können wir hier vernachlässigen.

Für die mittlere Aufenthaltszeit τ_B und für die Rotationskorrelationszeiten τ_{cb} und τ_{cB} nehmen wir an, daß sie nach der Arrhenius-Gleichung von der Temperatur abhängen:

$$\tau = \tau^{(0)} \cdot \exp\left(\frac{\Delta E}{RT}\right) \quad (13)$$

Mit den Gln. (5) und (6) läßt sich dann ohne weiteres das Minimum des Relaxationsratenzuwachses in Abb. 3 verstehen. Bei tiefen Temperaturen tauschen DNA-Protonen oder fest gebundene Wassermoleküle langsam mit freiem Wasser aus, so daß sie nicht merklich zur Relaxation beitragen. Weniger fest gebundene Wassermoleküle dagegen tauschen so schnell aus, daß $\tau_b < T_{1b}$ ist, außerdem ist $\omega \tau_{cb} \ll 1$, es wird also bei tiefen Temperaturen

$$\Delta (1/T_1) = x_b \cdot C \cdot 5 \cdot \tau_{cb} \quad (14)$$

Vergleichen wir die Konstanten nach (9) und (12), so sollte nach Gl. (14)

$$\frac{\left(\Delta \frac{1}{T_1}\right)_{D_2O}}{\left(\Delta \frac{1}{T_1}\right)_{H_2O}} = \frac{C_Q}{C_{DD}} = 11.0 \quad (15)$$

sein. Wir finden aber für dieses Verhältnis experimentell einen Wert von 6. Diese Diskrepanz läßt sich mit der Anwesenheit von Schwermetallionen erklären. Wir nehmen an, daß Gl. (10) den Ratenzuwachs in der D_2O -Lösung richtig beschreibt, dann ist für die H_2O -Lösung ein Term hinzuzufügen, der den Beitrag der Schwermetallionen beschreibt:

$$\left(\Delta \frac{1}{T_1}\right)_{H_2O} = x_b \cdot C_{DD} \cdot 5\tau_{cb} + R_M \quad (16)$$

Bei tiefen Temperaturen wird somit der Ratenzuwachs in H_2O in etwa zur Hälfte von Schwermetallionen bestimmt. Aus den Messungen in der D_2O -Lösung folgt mit Gl. (14) und der Bedingung $\omega \tau_{cb} \ll 1$ eine untere Grenze für den Molenbruch der gebundenen Moleküle. Da in H_2O bis zur Frequenz $\omega/2\pi = 60$ MHz keine Frequenzabhängigkeit gemessen wurde, muß in unserem Modell $\tau_{cb} < 10^{-8}$ s bei 4 °C sein. Damit folgt aus Gl. (14) $x_b > 0,005$. Da $x_{BP} = 0,003$, muß man also annehmen, daß mehr als ein Wassermolekül pro Basenpaar zum Ratenzuwachs bei tiefen Temperaturen beiträgt. Als Aktivierungsenergie für die Rotation dieser gebundenen Moleküle ergibt sich $\Delta E_{cb} = 7,2$ kcal/Mol.

Bei hohen Temperaturen wird der Austausch der DNA-Protonen oder der fest gebundenen Wassermoleküle schneller, so daß der zweite Term in Gl. (5) merklich zur Relaxation beiträgt. Insgesamt ergibt sich eine gute Übereinstimmung zwischen unseren Meßwerten und Gl. (5) mit (13), wenn für die Parameter nach Gl. (13) die in Tab. III angegebenen Werte eingesetzt werden. Zur Berechnung dieser Werte wurde angenommen, daß R_M in Gl. (12) mit derselben Aktivierungsenergie von der Temperatur abhängt wie τ_{cb} . Richtigter wäre es, für R_M die in Abb. 6 dargestellte Temperaturabhängigkeit mit der Aktivierungsenergie $\Delta E \approx 3,5$ kcal/Mol anzunehmen. Wenn man annimmt, daß R_M und x_b/T_{1b} bei der tiefsten Temperatur zu gleichen Teilen zur Relaxation beitragen, ergeben sich dann wesentlich größere Werte für die Aktivierungsenergien ΔE_B und ΔE_{cB} und sehr kleine Werte für $\tau_{B(0)}$ und $\tau_{cB(0)}$. Die in Tab. III

Tab. III. Parameter nach Gl. (9) zur Beschreibung des Rateninkrements bei hohen Temperaturen.

x_B	ΔE_B [kcal/Mol]	$\tau_{B(0)}$ [s]	$\tau_B(80^\circ\text{C})$ [s]	ΔE_{cB} [kcal/Mol]	$\tau_{cB(0)}$ [s]	$\tau_{cB}(80^\circ\text{C})$ [s]
0,003	11,5	$0,83 \cdot 10^{-9}$	0,012	9,8	$0,31 \cdot 10^{-14}$	$0,37 \cdot 10^{-8}$
0,01	9,4	$0,75 \cdot 10^{-7}$	0,052	9,2	$0,25 \cdot 10^{-13}$	$0,13 \cdot 10^{-7}$
0,03	9,2	$0,29 \cdot 10^{-6}$	0,16	9,2	$0,78 \cdot 10^{-13}$	$0,403 \cdot 10^{-7}$

angegebenen Aktivierungsenergien sind also lediglich als untere Schranken der tatsächlichen Aktivierungsenergien anzusehen. Die Kurven der Abb. 3 wurden mit den Werten aus Tab. III für $x_B = 0,003$ berechnet.

Ob austauschende DNA-Protonen oder besonders fest gebundene Wassermoleküle den Meßeffekt bei hohen Temperaturen verursachen, sollte im Prinzip durch die Messung in der D_2O -Lösung unterschieden werden können, da ihre Konstanten nach Gl. (11) und (12) sich um eine Größenordnung unterscheiden. Verwenden wir die Parameter nach Tab. III, die allein aus den in H_2O -Lösung gefundenen Meßwerten berechnet wurden, um den Ratenzuwachs in D_2O -Lösung zu berechnen, so erhalten wir die beiden Kurven in Abb. 4, und zwar die obere Kurve für D_2O , die untere für $-ND_2$. Obwohl es nach diesen Kurven naheliegt, den Meßeffekt den Aminoprotonen zuzuschreiben, ist diese Deutung bei der Unsicherheit unserer Meßwerte nicht gesichert.

Diskussion

Wir haben bei der Deutung unserer Messungen darauf verzichtet, hydrophobe Wechselwirkungen (vgl. HERTZ²¹) zu diskutieren, da wir annehmen, daß im gesamten untersuchten Temperaturbereich nur die hydrophilen Aminogruppen, nicht aber die hydrophoben Kerne der Basen mit dem Lösungsmittel Kontakt haben. Das Minimum des Relaxationsratenzuwachses und die Frequenzabhängigkeit bei hohen Temperaturen können durch das Modell dreier Phasen, zwischen denen Austausch stattfindet, nach ZB beschrieben werden. Die Frage, ob bei hohen Temperaturen Aminoprotonen oder besonders fest gebundene Wassermoleküle zur Relaxation beitragen, kann eindeutig erst durch wesentlich aufwendigere Messungen (Änderungen von pH-Wert und Ionenstärke, vgl. LEWIN¹², Messung der ^{17}O -Relaxation) entschieden werden. Letztere Erweiterung der Messungen ist geplant. Zur Deutung des Relaxationsratenzuwachses bei tiefen Temperaturen haben wir uns hier auf das Modell von ZB beschränkt. Im Rahmen dieses Modells bedeutet τ_{cb} die Rotationskorrelationszeit der gebundenen Wassermoleküle. Es muß aber betont werden, daß dieses nicht die einzige mögliche Deutung ist. Nimmt man an, daß die mittlere Lebensdauer dieser gebundenen Moleküle nicht nur klein ist im Vergleich zur Kernspinrelaxationszeit, sondern ver-

gleichbar oder kleiner als die Rotationskorrelationszeit, so ist, wie oben erwähnt, die Theorie von BECKERT und PFEIFER⁸, die von SILLESCU^{9a} in allgemeinerer Form neu hergeleitet und begründet wurde, anzuwenden.

Falls in dieser Theorie, $x_b \ll 1$ und $\omega \tau_{cb} \ll 1$ ist, ergibt sich unabhängig von dem dort eingeführten „Korrelationskoeffizienten“ anstelle von Gl. (14)

$$\Delta \frac{1}{T_1} = x_b \cdot 5 \cdot C \cdot \tau \quad (17)$$

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_{cb}} + \frac{1}{\tau_b} \quad (18)$$

Ist hierbei $\tau_b \ll \tau_{cb}$, so wird also der Ratenzuwachs der schnell austauschenden Moleküle allein von der Austauschzeit τ_b bestimmt. Die aus unserer Messung in D_2O gefundene Abschätzung der Aktivierungsenergie ΔE_{cb} ist in diesem Fall als Aktivierungsenergie für den Austauschprozeß, ΔE_b , zu deuten. Diese stimmt überraschend gut mit der von BRÜSSAU und SILLESCU^{9b} für D_2O -Lösungen von Polyvinylpyrrolidon gefundenen Aktivierungsenergie $E_a(\tau) = 7,0 \pm 1,2$ kcal/Mol überein.

Herrn Professor Dr. A. REDHARDT danke ich für die Anregung und Förderung dieser Arbeit, Herrn Professor Dr. R. K. ZAHN danke ich für die Präparation der DNA-Proben und für Diskussion der biochemischen Probleme.

- ¹ M. J. B. TUNIS u. J. E. HEARST, Biopolymers 6, 1325 [1968].
- ² a. B. LUBAS u. T. WILCZOK, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 120, 427 [1966].
b. B. LUBAS u. T. WILCZOK, Biopolymers 5, 967 [1967].
c. B. LUBAS u. T. WILCZOK, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 224, 1 [1970].
- ³ a. H. SPRINZ, R. DÖLLSTÄDT u. G. HÜBNER, Biopolymers 7, 447 [1969].
b. R. DÖLLSTÄDT u. H. SPRINZ, Z. Naturforsch. 25b, 1027 [1970].
- ⁴ F. NOACK, NMR Basic Principles and Progress, vol. III, Editors: P. DIEHL, E. FLUCK u. R. KOSFELD, Springer-Verlag 1971.
- ⁵ R. K. ZAHN, E. TIESLER, A. K. KLEINSCHMIDT u. D. LANG, Biochem. Z. 336, 281 [1962].
- ⁶ B. HEICKE, Naunyn-Schmiedberg Arch. de Pharmacol. 266, 140 [1970].
- ⁷ J. ZIMMERMANN u. W. E. BRITTIN, J. physic. Chem. 61, 1328 [1957].
- ⁸ D. BECKERT u. H. PFEIFER, Ann. Physik 7. F. 16, 262 [1965].
- ⁹ a. H. Sillescu, J. chem. Physics 54, 2110 [1971].
b. R. G. BRÜSSAU u. H. SILLESCU, Ber. Bunsenges. physik. Chem. 76, 31 [1972].
- ¹⁰ H. G. HERTZ u. M. D. ZEIDLER, Ber. Bunsenges. physik. Chem. 67, 311 [1963].

- ¹¹ a. M. FALK, K. A. HARTMANN JR. u. R. C. LORD, J. Amer. chem. Soc. **84**, 3843 [1962].
b. M. FALK, K. A. HARTMANN JR. u. R. C. LORD, J. Amer. chem. Soc. **85**, 387 [1963].
c. M. FALK, K. A. HARTMANN JR. u. R. C. LORD J. Amer. chem. Soc. **85**, 391 [1963].
¹² S. LEWIN, J. Theoret. Biol. **17**, 181 [1967].
¹³ J. EISINGER, R. G. SHULMAN u. B. M. SZYMANSKI, J. chem. Physics **36**, 1721 [1962].
¹⁴ a. M. P. PRINTZ u. P. H. VON HIPPEL, Federat. Proc. **24**, 539 [1965].
b. M. P. PRINTZ u. P. H. VON HIPPEL, Biochemistry **7**, 3194 [1968].
¹⁵ H. FRITZSCHE, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **149**, 173 [1967].
¹⁶ Z. LUZ u. S. MEIBOOM, J. chem. Physics **40**, 2686 [1964].
¹⁷ A. ABRAGAM, The Principles of Nuclear Magnetism, Oxford University Press 1970.
¹⁸ K. KRYNICKI, Physica **32**, 167 [1966].
¹⁹ V. SARASWATI u. R. VIJAYARAGHAWAN, Magnetic Resonance and Relaxation, Proc. of the XIVth Colloque Ampére 1966, p. 767, (R. BLINC (ed.)).
²⁰ J. A. GLASEL, Proc. nat. Acad. Sci., USA **58**, 27 [1967].
²¹ H. G. HERTZ u. M. D. ZEIDLER, Ber. Bunsenges. physik. Chem. **68**, 821 [1964].