

Messungen der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 an Nucleosiden

Spin-Lattice-Relaxationtime T_1 Measurements of Nucleosides

H. Sterk, H. Kopp und H. Esterbauer

Institut für Organische Chemie und Institut für Biochemie der Universität Graz.

Z. Naturforsch. **34 c**, 503 – 507 (1979); eingegangen am 29. Januar/2. April 1979

Spin Lattice Relaxationtime T_1 , Nucleosides, Nucleotides, Association Phenomena, Temperature Dependence

Nucleosides and nucleotides have been investigated by means of the spin-lattice-relaxationtime T_1 , the measurements carried out in CDCl_3 on the nucleosides adenosine (A), uridine (U) and inosine (I) indicate that the strength of H-bonding is highest in the basepair (A)–(U). The systems (A)–(A), (U)–(U), (I)–(A) and (I)–(U) however, show only a low tendency to associate. Plotting the spin-lattice-relaxationtime, of the nucleotide protons in fragments (mol weight below 40,000) originated from DNA or RNA, against increasing temperature gives a curve with a sigmoidal shape and a T_m value of 80 °C. The average of the activation energy for the H-bonding is 18.02 KJ/mol. The investigations clearly show that the spin-lattice-relaxationtime measurements open first of all a new method for research on H-bonding, secondly it is even in the case of nucleosides and oligonucleotides, where most of the common methods fail, a way to get information about H-bonding effects.

Einleitung

Kernresonanzmessungen zur Eigenassoziation von Nucleosiden [1–4] sind bereits mehrfach durchgeführt worden. Da sich die Relaxationszeitanalyse [5] als sehr effiziente Methode zur Untersuchung von verbrückten Systemen angeboten hat, soll sie auch auf den Problemkreis der Basenpaarung angewandt werden, um Aussagen über die Stabilität der Brücken zwischen verschiedenen Nucleosidabkömmlingen machen zu können.

Experimenteller Teil

Die Messungen der Spin-Gitter-Relaxationszeit sind an entgasteten Proben nach der Inversion-Recovery-Methode [6] durchgeführt worden. Mittlerer Fehler ca. 5%, Meßtemperatur 31 °C, Varian HA-100D-Kernresonanzgerät für fouriertransformierte Spektren modifiziert (DIGILAB Inc. Nova 1200 Computer von Data General).

DNA Type III Na-Salz aus Lachstestes (Sigma Chemical Company) abgebaut mit Deoxyribonuclease I von Bovine Pancreas (Sigma Chemical Company) mittleres Molekulargewicht laut Untersuchung mit Sephadex etwa 40 000. RNA Type VI aus Bäckerhefe (Sigma Chemical Company) abgebaut mit

Ribonuclease Nr. 7103126 (Boehringer Mannheim GmbH), mittleres Molekulargewicht etwa 40 000 (Sephadex G 75).

Ergebnis und Diskussion

Um zunächst das assoziative Verhalten mit sich selbst zu erfassen, sind 2'.3'-Isopropylidenadenosin-5'-monoacetat (A) und 2'.3'.5'-Triacetyluridin (U) sowie 2'.3'.5'-Triacetylinosin (I) bei verschiedenen Konzentrationen in CDCl_3 als Lösungsmittel untersucht worden.

Der allgemeine Anstieg der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 bei Abnahme der Konzentration ist generell sichtbar. Die stärksten Anstiege sind bei brückenbildenden Protonen NH und NH_2 sowie den Protonen des Heterocycluses feststellbar.

Formal kann man das skizzierte Verhalten erklären, wenn man berücksichtigt, daß

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1\text{intra}}^{\text{DD}}}$$

$$\text{wobei} \quad \frac{1}{T_{1\text{intra}}^{\text{DD}}} = \frac{3}{2} \frac{h^2 \gamma^4}{r^6} \tau_C \quad (1)$$

$$\tau_C = \frac{4\pi\eta a^3}{3kT} \quad (\text{ref. 5}) \quad (2)$$

geschrieben werden kann.

* γ : Gyromagnetische Konstante; η : Viskosität; a : Molekularradius; τ_C : Korrelationszeit – extrem narrowing condition; r : Intramolekularer H–H-Abstand.

Sonderdruckanforderungen an ao. Univ.-Prof. Dr. Heinz Sterk, Institut für Organische Chemie, Universität Graz, Heinrichstraße 28, A-8010 Graz.

0341-0382/79/0700-0503 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

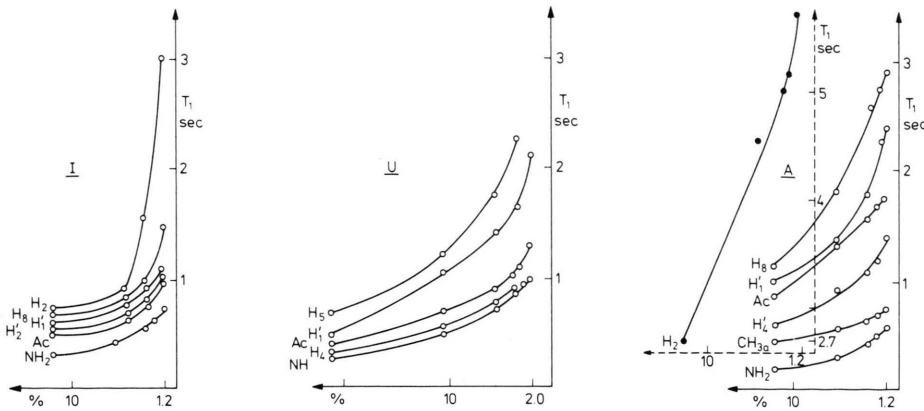


Abb. 1. Gewichtsprozent 2',3'-Isopropylidenadenosin-5'-monoacetat (A), 2',3',5'-Triacetyluridin (U) sowie 2',3',5'-Triacetyluridin (I) gegen die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 . Die Symbole charakterisieren die bei der angegebenen Verdünnung exakt beobachtbaren Protonen (CH_{3a} : Isopropylgruppe; H' : Protonen der Ribose). Mittlerer Fehler $\pm 5\%$.

Das bedeutet, daß sich die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 ausschließlich aus der intramolekularen Dipol-Dipol-Relaxationszeit $T_{1\text{intra}}^{\text{DD}}$ (1) aufbaut. Für verdünnte Lösungen sowie die Relaxation von ^1H stellt diese Annahme, ebenso wie die Beschreibung der Korrelationszeit τ_C nach Bloembergen [7] (2) keine gewichtige Simplifikation dar.

Beachtet man, daß bei Verdünnung an den Verbindungen selbst keine Änderungen eintreten und auch für die Viskosität im dargestellten Bereich $\eta = \text{konst.}$ in 1. Näh. gelten muß, so folgt zwangsläufig der Schluß, daß nur die Molekülgröße a für die oben beschriebenen Änderungen zuständig sein kann. Für Assoziationen gilt nach Zeidler [8]

$$* (a^*)^3 = k p_0 a_0^3 + k p_1 a_1^3 + k p_2 a_2^3 \dots \quad (3)$$

das heißt auf die Ergebnisse übertragen, daß bei fortschreitender Verdünnung die Assoziationen aufbrechen ($p_0 \gg p_1$) und folglich auch die Radien ($a_1^3 \gg a_0^3$) kleiner werden.

Der Grad des T_1 -Anstiegs in Abb. 1 läßt auf eine erhebliche Selbstassoziation der Nucleoside schließen. Interessant ist, daß auch die an der Ribose lokalisierten Protonen in ihrem T_1 -Verhalten den Basenprotonen ähneln und drastisch in das mikrodynamische Geschehen (3) einbezogen werden.

* p : Häufigkeit der durch das jeweilige Subskript angegebenen Verbrückung; a : der, dem durch jeweilige Subskript beschriebenen Assoziat, entsprechende Radius; a^* : effektiver Radius für (2); k : Konstante der Aktivierungsenergie.

Nachdem die Eigenassoziation sich in der Verdünnung manifestiert hat, ergibt sich sofort die Frage nach der Mischassoziation. Um hier Einblick zu gewinnen, sind die verschiedenen Basen in Lösung, unter Konstanthaltung der Gesamtkonzentration, kombiniert worden. Dadurch sind Viskositäts- und Verdünnungseffekte ausgeschlossen.

Wie Abb. 2 zeigt, kommt es beim Mischen zur Ausbildung stabiler Brücken zwischen den beiden Partnern, da nur stabile Brücken eine Zunahme der Zahl der gebundenen Systeme und/oder gleichzeitige Erhöhung der Lebensdauer nach sich ziehen, welche letztlich via (3) zu einer formalen Vergrößerung von a mit allen Konsequenzen (1) Anlaß gibt.

Um auf die Frage, inwieweit sich in obigem Ergebnis die energetische Einmaligkeit des Paares (A)–(U) widerspiegelt, eine Antwort geben zu können, ist das Verhalten beider Basen bezüglich anderer Brückenpartner analysiert worden und zwar soll das Verhalten der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 von (U) mit 2-Aminopyridin sowie von (A) mit Pyridon stellvertretend für andere Paare diskutiert werden.

Während für (U)-2-Aminopyridin T_1 mit Verdünnung steigt (Auflösung der Selbstassoziation), ist in Abb. 3 für die Protonen am Heterocyclen von (A) ein Absinken der T_1 -Zeit bei Zugabe von Pyridon beobachtbar. Die Beschränkung des Effektes auf die Protonen des Heterocyclen läßt die Annahme eines langlebigen, wie eine eigene Molekel reagierenden, brückengebundenen Assoziates – wie im Fall Abb. 2 – jedoch nicht mehr zu. Vielmehr kann der Effekt

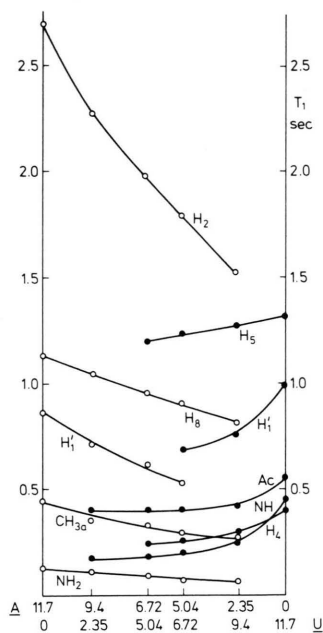


Abb. 2. 2',3'-Isopropylidenadenosin-5'-monoacetat (A) und 2',3',5'-Triacetyluridin (U) Mischungen in Gewichtsprozenten gegen die Spin-Gitter-Relaxationszeit. Die Symbole charakterisieren hier, sowie in den folgenden Abbildungen, die beobachteten Protonen, die Messung der T_1 -Zeit erfolgte wenn ihr mittlerer Fehler 5% nicht übersteigt. Konzentrationen für welche ein größerer Fehler meßtechnisch nicht umgehbar ist, sind nicht dargestellt worden. Desgleichen fehlen Protonen, deren Lage durch andere Protonen teilweise maskiert ist.

des Pyridons auf das Adenosin nur mehr in der Ausbildung eines losen hinsichtlich des Radius a getrennten Komplexes mit zusätzlicher intermolekularer Dipol-Dipol-Relaxation (zwischen (A) und Pyridon) bestehen.

Das Verhalten zu einem anderen Nucleosid, wie 2',3',5'-Triacetyluridin (I), ist in Abbn. 5, 6 dargestellt.

Bezüglich (U) zeigt (I) eine konstante Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 . Die Assoziation zwischen (A) und (I) schlägt sich in den T_1 -Zeiten von (A) als Absenkung, in (I) als Zunahme deutlich nieder. Kreuzungsversuche mit Cytosin und Guanosin sind wegen fehlender Löslichkeit der beiden Basen in CDCl_3 nicht möglich.

Die Abhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 der einzelnen Paare sowie der verschiedenen Protonen von der Konzentration – es wurde in den Abbildungen Wert darauf gelegt, daß zumindest die Protonen der Heterocyklen eindeutig charakterisiert

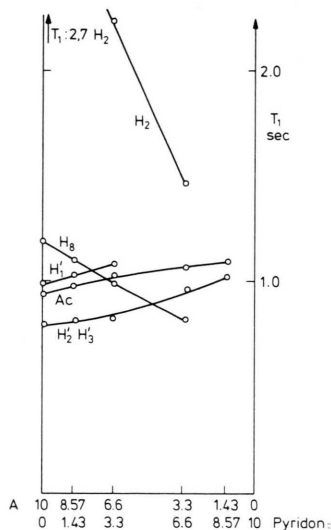


Abb. 3. 2',3'-Isopropylidenadenosin-5'-monoacetat (A) und 2-Pyridon in verschiedenen Gewichtsprozenten gegen die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 .

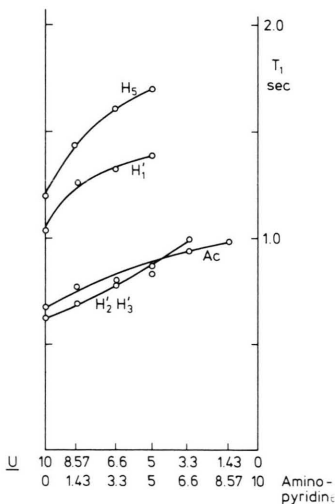


Abb. 4. 2',3',5'-Triacetyluridin (U) und 2-Aminopyridin in verschiedenen Gewichtsprozenten gegen die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 .

sind –, eröffnet zwar keine quantitative Aussage-möglichkeit hinsichtlich der Brückenmechanismen, semiquantitative Abschätzungen sind jedoch sehr gut möglich.

Sämtliche Abschätzungen laufen dabei über die vergleichende Betrachtungsweise des Selbstassoziationsverhaltens und des Mischassoziationsverhal-

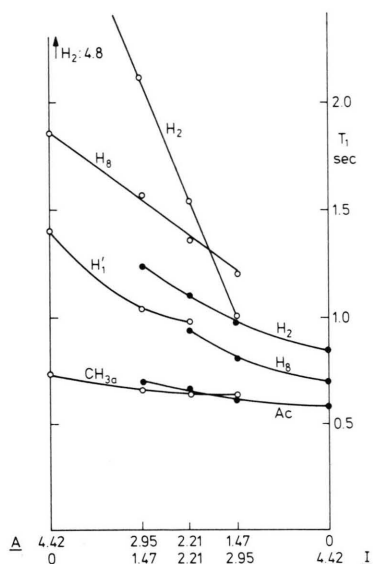


Abb. 5. 2',3'-Isopropylidenadenosin-5'-monoacetat (A) und 2',3',5'-Triacetylinosin (I) Mischungen in verschiedenen Gewichtsprozenten gegen die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 .

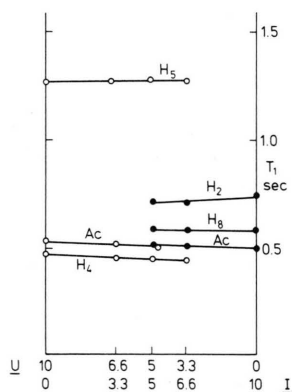


Abb. 6. 2',3',5'-Triacetylinosin (I) und 2',3',5'-Triacetyluridin (U) Mischungen in verschiedenen Gewichtsprozenten gegen die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 .

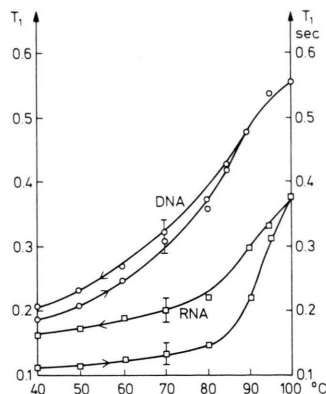


Abb. 7. RNA (□) und DNA (○) bei variabler Temperatur (°C) gegen die Spin-Gitter-Relaxationszeit. Bei Temperaturerhöhung und Abkühlung gemessen. Die Marke gibt den mittleren Fehler, der für alle Temperaturen konstant ist, an. RNA und DNA gemessen in D_2O .

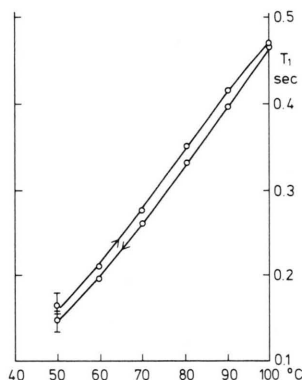


Abb. 8. ATP bei variabler Temperatur (°C) gegen die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 . Bei Temperaturerhöhung und Abkühlung gemessen. Die Marke gibt – wie Abb. 7 – den mittleren Fehler an. ATP gemessen in D_2O .

tens und erlauben die Charakterisierung von 3 Verhaltensgruppen.

i) Beide Partner zeigen beim Mischen (Gesamtkonzentration = konstant) eine Absenkung der Relaxationszeit, z. B. (A)–(U). Nach dem Vorhergesagten bedeutet dies die Ausbildung begünstigter langlebiger Brückenstrukturen. Im Falle (I)–(U) halten sich die Ausbildung von Brücken zwischen den Partnern und die Selbstassoziation gerade die Waage.

ii) Einer der Partner weist einen verdünnungsbedingten Anstieg der Relaxationszeit auf. Dies bedeutet, daß die Selbstassoziation das Verhalten bestimmt. Vergleiche (U)–2-Aminopyridin sowie (A)–(I). Im letzteren Fall zeigt sich jedoch durch das unterschiedliche T_1 -Verhalten sehr überzeugend, daß die Assoziationsstärke von (I) mit (I) größer als von (A) mit (I), diese jedoch wiederum größer als die Selbstassoziation von (A) mit (A) ist.

iii) Der letzte Fall (A)–(Pyridon zeichnet sich wie im obigen Text bereits diskutiert, durch Ausbildung schwacher Brücken aus. (Blockierung des NH's im Pyridon durch eine Methylgruppe bringt den Effekt zum Verschwinden.)

Versucht man die Untersuchungen der H-Brücken von den Nucleosiden auf die makromolekularen Polynucleotide zu übertragen, so bieten sich die Temperaturabhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 von DNA und RNA als besonders signifikant an. Abb. 7 zeigt z. B. die Temperaturabhängigkeit der T_1 -Zeit von DNA und RNA gemessen an der Methylgruppe des Thymins. Der Verlauf entspricht dabei einem Verhalten wie es aufgrund des Aufbrechens von H-Brücken zu erwarten ist. Tatsächlich ist Lage und Verlauf der Kurve weitgehend äquivalent den sogenannten Aufschmelzkurven, die mit anderen Methoden gefunden wurden [9, 10]. Die Tatsache, daß effektive Änderungen am System RNA oder DNA erfolgen, kann durch Untersuchungen der Temperaturabhängigkeit anderer Systeme wie ATP, die keine Temperaturabhängigkeit erkennen lassen, untermauert werden. Die teilweise Irreversibilität beim Abkühlen stellt ein Maß für den Denaturierungsprozeß dar. Die für die Temperaturänderung bei DNA berechenbare Aktivierungsenergie E_a nach

$$\tau_C = \tau_{C_0} e^{\frac{E_a}{RT}}$$

liefert einen Wert von $E_a = 18,02$ KJ/mol und stimmt mit Literaturwerten, die nach anderen Methoden gemessen worden sind, gut überein (vergleiche Pörschke [11]: 21,79 KJ/mol).

Zusammenfassung

Strukturänderungen von Nucleinsäuren bei der Aufspaltung von Wasserstoffbrücken lassen sich aufgrund der Zunahme der UV-Absorption, der Abnahme der Viskosität sowie der Änderung der optischen Drehung verfolgen. Diese Methoden eignen sich nur für hochmolekulare Systeme, über H-Brücken in Oligonucleotiden und Nucleosiden können sie jedoch keine Aussage liefern. Wie unsere Untersuchungen eindeutig zeigen, kann bei diesen Systemen die Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeit der Nucleosidprotonen [12] mit Erfolg eingesetzt werden. Zusätzlich ergeben sich aus der Temperaturabhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxationszeit Aussagen über die Stabilität und Lebensdauer von H-Brücken in Nucleosiden und Oligonucleotiden.

Danksagung

Dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung gebührt Dank für die Gewährung von Projekt Nr. 1259 und Projekt Nr. 1798.

- [1] U. Krüger, H. Breuer, F. M. A. Kerim, H. H. Perkampus u. K. H. Scheit, *Z. Naturforsch.* **23 b**, 1360 (1968).
- [2] E. Lippert, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **67**, 267 (1963).
- [3] E. Westhof, O. Röder, I. Croneiss u. H. D. Lüdemann, *Z. Naturforsch.* **30 c**, 131 (1975).
- [4] M. Remin, E. Darzynkiewicz u. A. Dworak, *J. Amer. Chem. Soc.* **98**, 367 (1976).
- [5] R. S. Norton u. A. Allerhand, *J. Amer. Chem. Soc.* **98**, 1007 (1976).
- [6] R. Freeman u. H. D. W. Hill, *J. Chem. Phys.* **53**, 4103 (1970).
- [7] N. Bloembergen, E. M. Purcell u. R. V. Pound, *Phys. Rev.* **73**, 679 (1948).
- [8] H. G. Hertz u. M. D. Zeidler (P. Schuster, G. Zundel u. C. Sandorfy, eds.), *The Hydrogen Bond*, **Bd. III**, S. 1041, North Holland Publishing Company 1976.
- [9] B. Lubas, T. Wilczok u. O. K. Daszkiewicz, *Biopolymers* **5**, 967 (1967).
- [10] A. G. Marshall, P. G. Schmidt u. B. D. Sykes, *Biochemistry*, **11**, 3875 (1972).
- [11] D. Pörschke, *Biochemistry* **15**, 1495 (1976).
- [12] A. P. Zens, Th. A. Bryson, R. B. Dunlap, R. R. Fisher, P. D. Ellis, *J. Amer. Chem. Soc.* **98**, 7559 (1976).