Stabilitätskonstanten einiger Co^{2+} -, Ni^{2+} - und Ag^+ -Nucleotide

Stability Constants of some Co^{2+} -, Ni^{2+} -, and Ag^+ -nucleotides

U. WESER und M. DÖNNICKE

Physiol.-Chem. Institut der Universität, 74 Tübingen
und King's College London, S.E. 24, 68 Half Moon Lane

(Z. Naturforsch. **25 b**, 592–595 [1970]; eingegangen am 20. Februar 1970)

The stability constants of some Co^{2+} , Ni^{2+} and Ag^+ nucleotides have been measured employing difference spectrophotometry. AMP, ADP, ATP, salmon sperm DNA and nuclear RNA from rat liver served as ligands. In all studies the numerical values of $\log \beta$ ranged in the same order of magnitude, generally about 4.3 ± 0.4 . According to neglecting differences in the absorbancy at 260 nm the theory was confirmed that Co^{2+} and Ni^{2+} nucleotides may be assigned to metal chain complexes i. e. the metals are preferentially coordinated with the phosphate chain of the nucleotides. This is in contrast to profound changes of E_{260} if Ag^+ ions were used. These complexes are to be considered as rather pure metal-base complexes where the metal ion is strongly suggested to be bound to the nitrogen atoms of the heterocyclic base pairs.

Strukturelle und chemische Untersuchungen von Metallkomplexen mit monomeren und polymeren Nucleotiden weisen auf die Möglichkeit hin, daß derartige Komplexe im biochemischen Geschehen von entscheidender Bedeutung sein können¹. Außer einer Modellverbindung, einem Hg-DNA-Komplex² ist es bislang nicht gelungen Metall-Polynucleotid-Komplexe aus natürlichen biochemischen Systemen zu isolieren.

Injektionen freier Metallaquokomplexe zeigen teilweise eine beachtliche Reaktivität im Nucleinsäurestoffwechsel^{3–5}. Umfangreiche Versuche sind darüber mit Zn^{2+} angestellt worden. Die Isolierung eines nativen Zn-DNA-Komplexes erwies sich mit den herkömmlichen Methoden äußerst problematisch. Die dazu notwendigen Pufferlösungen, die hohe Ionenstärken oder Chelatkomplexbildner enthielten, verursachten die Dissoziation solch eines Metall-DNA-Komplexes. Verteilungsstudien mit $^{65}\text{Zn}^{2+}$ zeigen aber, daß die höchste Konzentration an diesem Metallion im Zellkern auftritt^{6,7}. Die Möglichkeit, daß Zn^{2+} -Ionen an die Polynucleotide des Zellkernes gebunden sind, kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Auf der Suche nach stabilen Metall-Nucleotidkomplexen werden in dieser Arbeit die Stabilitätskonstanten einiger Co^{2+} -, Ni^{2+} - und Ag^+ -Nucleotide spek-

trophotometrisch bestimmt. Die Anwendung der Differenzspektrophotometrie schien von erheblicher Bedeutung zu sein, da zusätzlich Rückschlüsse auf den Bindungsort der jeweiligen Metallionen an die Nucleotide möglich sind. Ferner können dabei Metallionenkonzentrationen eingesetzt werden, wie sie in natürlichen biochemischen Systemen vorkommen. Die Messungen werden mit den Liganden AMP, ADP, ATP, Lachsspermien-DNA und nucleare RNA aus Rattenleber ausgeführt. Nach einem Strukturmodell, das von PHILLIPS⁸ für die Metallpolynucleotide postuliert wurde, wäre zu erwarten, daß Co^{2+} und Ni^{2+} vorwiegend an die Phosphatgruppen der Nucleotide gebunden sind. Ag^+ das stärker zum Stickstoff koordiniert ist, dürfte dagegen hauptsächlich an die heterocyclischen Basenreste gebunden sein. Dies müßte aus einer Änderung der UV-Absorption der Nucleotide in Gegenwart verschiedener Metallionen hervorgehen.

Experimentelles

Chemikalien: Lachsspermien-DNA, hochpolymer, lyophilisiert, reinst, Hyperchromizität 36%; Serva, Heidelberg. ATP, ADP und AMP; Boehringer, Mannheim. Alle übrigen Chemikalien waren von analysenreiner Qualität und wurden von den Firmen Merck, Flucka oder Riedel de Haen bezogen.

¹ U. WESER, Structure and Bonding **5**, 41 [1968].

² B. SCHLATTERER, biochemische Diplomarbeit, Tübingen 1969.

³ U. WESER, S. SEEGER u. P. WARNECKE, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **179**, 422 [1969].

⁴ U. WESER, S. SEEGER u. P. WARNECKE, Z. Naturforsch. **24b**, 866 [1969].

⁵ L. HÜBNER, biochemische Diplomarbeit, Tübingen 1970.

⁶ U. WESER u. E. BISCHOFF, European J. Biochem. **12**, 571 [1970].

⁷ U. WESER u. H. BRAUER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **204**, 549 [1970].

⁸ R. S. J. PHILLIPS, Chem. Reviews **66**, 501 [1966].

Biologisches Material: Weiße Wistar-Ratten (160 ± 20 g) wurden von der Fa. Ivanovas, Kisslegg, erworben. Sie erhielten Normaldiät (Altromin R) und Wasser ad libitum. Die Isolierung von Leberzellkernen erfolgte in Saccharoselösung unterschiedlicher Dichte $9-11$.

RNA aus Leberzellkernen: RNA wurde aus Leberzellkernen mit Phenol-Na-dodecylsulfat extrahiert $9-11$. Um Störungen bei der spektrophotometrischen Bestimmung zu vermeiden wurde 8-Hydroxychinolin nicht verwendet. In frisch isolierter RNA konnte kein Protein nachgewiesen werden. Der Quotient E_{280}/E_{260} betrug 0,50.

Darstellung der Metallkomplexe: Alle Komplexe waren in 5 mM KNO_3 gelöst. Der pH-Wert der Proben lag bei $6,0 \pm 0,3$. Während den Messungen mit Co^{2+} und Ni^{2+} wurde deren Konzentration konstant gehalten und die Nucleotidkonzentration variiert. Im Falle des Ag^{+} wurde umgekehrt verfahren. Die variablen Komponenten wurden als konzentrierte Stammlösungen in einem Volumen von 0,02 ml den Proben zugefügt. Die daraus resultierende Volumzunahme beeinflusst die Meßgenauigkeit nicht.

Um Standardbedingungen bei allen Messungen zu schaffen, wurde folgende Reihenfolge eingehalten, 5 ml 5 mM KNO_3 -Lösung wurden in Polystyrolröhrchen vorgelegt. Die Zugabe von Ligand und Metallion folgte unmittelbar darauf. Nach gutem Durchschütteln (Vortex Mischer) wurde 5 Min. auf 55° erhitzt und nach einstündigem Stehenlassen bei 25° gemessen.

Bestimmung der Stabilitätskonstanten: Die Stabilitätskonstanten der Metall-Nucleotid-Komplexe wurde nach der Methode der Differenz-Spektrophotometrie bestimmt $12-14$. Zunächst wurden die Spektren der Co^{2+} - und Ni^{2+} -Aquoionen im sichtbaren Bereich mit einem „Zeiss-Spektralphotometer PRQ 20 AV“ aufgenommen. Bei den jeweiligen Absorptionsmaxima (Co^{2+} : 510 nm und Ni^{2+} : 395 nm) konstanter Metallionen-Konzentrationen wurde deren Extinktionsänderung nach Zugabe unterschiedlicher Nucleotid-Mengen mit einem „Zeiss PMQ II“ (ausgerüstet mit Magnetanschlag) in 5 cm MT 4 Küvetten gemessen. Die Bildung von Ag-Nucleotiden wurde analog anhand der Extinktionsänderung einer konstanten Nucleotidmenge nach Zugabe variabler Ag^{+} -Konzentrationen in 1 cm Quarz-Küvetten bei 260 nm verfolgt.

Zur graphischen Auswertung wurde der Quotient aus der Extinktionsänderung ΔE und der maximalen Extinktionsänderung $\Delta E_{\max}$ gegen den negativen dekadischen Logarithmus verschiedener Metallionen- oder Ligandenkonzentrationen aufgetragen. Der Wendepunkt der so ermittelten Kurve ist die Stabilitätskonstante $\log \beta$. ΔE ist die Differenz zwischen der Extinktion des freien Metallaquions und der Extinktion des Komplexes. Nach kontinuierlicher Zugabe von Metall-

ion oder Ligand erreicht ΔE ein Maximum, d. h. es kann keine weitere Extinktionsänderung festgestellt werden. Diese Extinktionsdifferenz wird als $\Delta E_{\max}$ bezeichnet.

Ergebnisse

Der charakteristische Verlauf der differenz-spektrophotometrischen Bestimmung verschiedener Metall-Nucleotidkomplexe ist am Beispiel des ATP in den Abbn. 1 und 2 dargestellt.

Abb. 1. Co-ATP und Ni-ATP: Graphische Bestimmung von $\log \beta$. Die Messungen erfolgten bei 25° in jeweils 5 ml 5 mM KNO_3 bei pH $6,3 \pm 0,1$ eine Stde. nach 5 min. Erhitzen auf 55° . Die Konzentration an Co^{2+} und Ni^{2+} wurde bei $4 \cdot 10^{-5}$ M konstant gehalten und der ATP-Zusatz von 10^{-3} M bis $6 \cdot 10^{-6}$ M variiert. Extinktionsänderungen wurden bei den betreffenden Absorptionsmaxima 510 nm (Co^{2+}) und 395 nm (Ni^{2+}) in 5 cm MT 4-Küvetten mit einem Zeiss PMQ II ermittelt.

Abb. 2. Ag-ATP: Bestimmung von $\log \beta$. Abweichend von der Versuchsanordnung in Fig. 1 wurde hier die ATP-Konzentration bei $4 \cdot 10^{-5}$ M konstant gehalten und der AgNO_3 -Zusatz von $2 \cdot 10^{-3}$ M bis $6 \cdot 10^{-6}$ M variiert. ΔE und $\Delta E_{\max}$ wurden in ein cm Quarz-Küvetten bei 260 nm mit einem Zeiss PMQ II gemessen.

⁹ C. C. WIDNELL u. J. R. TATA, Biochem. J. **92**, 313 [1964].
¹⁰ R. R. MCGREGOR u. H. R. MAHLER, Arch. Biochem. Biophysics **120**, 136 [1967].
¹¹ U. WESER, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **349**, 989 [1968].

¹² C. H. SUELTER u. W. MELANDER, J. biol. Chemistry **238**, 4108 [1963].
¹³ H. J. COATES, D. O. GORDON u. V. K. SRIVASTAVA, Biochem. biophysic. Res. Commun. **20**, 611 [1965].
¹⁴ S. E. BRYAN u. E. FRIEDEN, Biochemistry **6**, 2728 [1967].

Keine meßbare Komplexbildung konnte bei 25° nachgewiesen werden. Sämtliche Proben mußten auf 55° erwärmt werden. Diese Temperatur wurde auch von den Polynucleotiden toleriert, ohne daß dabei eine doppelsträngige DNA völlig „schmilzt“ oder Mononucleotide abgespalten werden. Die zeitliche Dauer der Erwärmung spielte keine große Rolle. Zwischen 1 und 30 Min. zeigten alle Proben konstante Extinktionswerte. Auch die Art des Abkühlens, langsam durch Stehenlassen bei 25°, oder schnell durch Abschrecken im Eisbad, zeigte keinen Effekt.

Die numerischen Daten der Stabilitätskonstanten weiterer Metall-Nucleotidkomplexe sind in der Tabelle zusammengefaßt.

Ligand	[log β] Co ²⁺	Ni ²⁺	Ag ⁺
Adenosin	-0,3 ^a	-0,17 ^a	3,9 ^b
AMP	3,9 ± 0,2	4,0 ± 0,2	4,2 ± 0,2
ADP	4,3 ± 0,2	4,3 ± 0,2	4,2 ± 0,2
ATP	4,3 ± 0,2	4,3 ± 0,2	4,3 ± 0,2
Lachsspermien-DNA	3,9 ± 0,2	c	4,4 ± 0,2
Leberzellkern-RNA	4,6 ± 0,2	c	c

Tab. 1. Stabilitätskonstanten einiger Komplexe von Co²⁺, Ni²⁺ und Ag⁺ mit Adenosin, Adenosinnucleotiden, DNA und RNA. Versuchsbedingungen siehe Abbn. 1 u. 2. Bei den Polynucleotiden wurde die Konzentration auf Mol P/l bezogen. ^a s. l. c.¹, ^b s. l. c.¹⁵, ^c Keine meßbare Komplexbildung.

Diskussion

Die numerischen Werte der Stabilitätskonstanten sämtlicher untersuchten Metall-Mononucleotide liegen in der gleichen Größenordnung. Sie stimmen im Falle von ADP und ATP recht gut mit den Ergebnissen anderer Bestimmungsmethoden überein. Für die Werte der Co²⁺- und Ag⁺-Polynucleotide stehen noch keine vergleichbaren Meßdaten zur Verfügung.

Die log β -Werte der Metall-AMP-Komplexe unterscheiden sich praktisch nicht von den Konstanten der übrigen Metall-Nucleotide. Es sei jedoch hervorgehoben, daß die hier angewandten Konzentrationen an Metallionen um 2 bis 3 Größenordnungen von den in früheren Untersuchungen¹ eingesetzten Ionenkonzentrationen (um 10⁻² M) abweichen. Entspre-

chende Messungen an Cu-DNA-Komplexen in Gegenwart vergleichbar geringer Cu²⁺-Konzentrationen geben ebenfalls beträchtlich höhere Werte für log β ¹⁴.

Bei konstanter Nucleotidkonzentration und variiertem Co²⁺- und Ni²⁺-Zusatz wurde die Frage geprüft, inwieweit diese Metallionen mit den heterocyclischen Basenresten reagieren können. Keine nennenswerte Extinktionsänderung konnte bei 260 nm festgestellt werden. Es scheint also, daß diese beiden Metallionen ausschließlich an die Phosphatgruppen der Nucleotide gebunden werden. Potentiometrische Messungen der Stabilitätskonstanten von Co²⁺- und Ni²⁺-Adenosinkomplexen unterstützen diese Beobachtung¹. Überraschend ist die Tatsache, daß die Bestimmung der Stabilitätskonstante für einen Polynucleotid-Ni-Komplex mit der Methode der Differenzspektrophotometrie nicht möglich ist. Eine Erklärung mag in der sterischen Anordnung des Komplexes liegen. Nickel hat eine ausgeprägte Tendenz quadratisch planare Komplexe zu bilden¹⁶. Einsträngige oder doppelsträngige Polynucleotide würden demnach stark behindernd wirken bzw. ist log K_1 viel zu klein um unter diesen Versuchsbedingungen bestimmt zu werden.

Als charakteristische Vertreter der Metall-Basenkomplexe können die verschiedenen Ag-Nucleotide angesehen werden. Aus der Änderung der UV-Absorption des heterocyclischen Basenrests in Gegenwart von Ag⁺-Ionen konnten sehr gut die numerischen Werte der Stabilitätskonstanten bestimmt werden. Auffallend ist, daß log β von Ag-Adenosin¹⁵ und die log β -Werte der Stabilitätskonstanten verschiedener Ag-Nucleotide nahezu identisch sind. Der Schluß liegt nahe, daß diese Konstante ausschließlich einem Ag-Basenkomplex zuzuschreiben ist, obwohl derartige Schlußfolgerungen mit großer Vorsicht auszuführen sind¹⁷. Offensichtlich kann bei den Ag-Polynucleotiden log β nur für einen Ag-DNA-Komplex bestimmt werden, während keine nennenswerte Komplexbildung mit einsträngigen Polynucleotiden (RNA) erkennbar ist. Im Ag-DNA-Komplex¹⁸ existieren 1 : 2-Komplexe deren log β genügend hoch liegt (Abb. 3).

Wird der log K_1 -Wert von Adenosin-Ag (~ 2,0)¹⁵ zugrunde gelegt, so wäre die Stabilität eines 1 : 1-Komplexes viel zu gering um in Gegenwart der

¹⁵ R. PHILLIPS u. P. GEORGE, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **162**, 73 [1968].

¹⁶ W. SCHNEIDER, Einführung in die Koordinationschemie, p. 39, Springer-Verlag, Berlin 1968.

¹⁷ P. W. SCHNEIDER u. H. BRINTZINGER, *Helv. chim. Acta* **47**, 187 [1964].

¹⁸ R. H. JENSEN u. N. DAVIDSON, *Biopolymers* **4**, 17 [1966].

Abb. 3. Strukturmodelle von 1 : 2 Ag-Desoxynucleotiden mit einem A-T- und einem G-C-Basenpaar.

niedrigen Konzentrationen an Ag^+ -Ionen und einsträngiger RNA ermittelt zu werden. Monomere Nucleotide können dagegen mit Ag^+ 1 : 2-Komplexe bilden.

Prinzipiell wäre die Existenz von Co^{2+} - und Ag^+ -DNA-Komplexen in biochemischen Systemen denkbar. Es dürfte auch zu erwarten sein, daß derartige Komplexe die Priming-Eigenschaften einer DNA verändern können. Untersuchungen in dieser Richtung wären von besonderem Interesse, da die jeweiligen Metallionen grundsätzlich an verschiedene Stellen des Polynucleotids gebunden sind.

Einer von uns (U. W.) möchte der European Molecular Biology Organization für ein long Term Fellowship danken.

Über das sterische Verhalten einer unterbrochenen Alpha-Helix

On the Steric Behaviour of an Interrupted Alpha-Helix

R. JAROSCH

Botanisches Institut der Universität Salzburg, Freisaalweg 16, Austria

(Z. Naturforsch. **25 b**, 595—599 [1970]; eingegangen am 2. März 1970)

The revolutions and motions of the side-chains occurring on an interrupted Alpha-Helix after a change in the length of its hydrogen-bonds have been described with the help of an elastic molecule-model.

Fig. 1 shows the directions of the revolutions (rotating arrows) after shortening of the hydrogen-bonds in the case of the same (a, b, c, d) and different coiling-sense (e, f, g) of the two helical segments fixed at definite points (indicated by tongs). After elongation of the hydrogen-bonds all arrows point to the opposite directions. In the case of fig. 1 g and longer helices a drift in the surroundings may appear which is always directed to the cleft between the helices (arrows). The straight arrows indicate the shifting-tendency in the surroundings caused by the wave-propagation of the rotating helix.

The side-chains between adjacent areas of the helices move towards each other in the cleft near the nonhelical region (compare e. g. the side-chains 5 and 16 in figs. 2 a and 2 b). Moreover extreme changes in the position of certain side-chains occur in the interhelical segment of the polypeptide-chain (13 in figs. 2 b and 4 b, 12 in fig. 3 b). The amide-groups of the interhelical segment become unstable if the interhelical segment contains more than 3—4 dissociated hydrogen-bonds. In this case the changes in the positions of its side-chains (e. g. 13, 14, 15 in figs. 5 b and 6 b) are determined and occur strongly *only* when the interhelical segment is fixed in its middle (e. g. by 15 in fig. 6 a).

The possible importance of the described movements for the conformational changes of globular proteins is discussed.

Wenn Längenänderungen in den H-Brücken der Alpha-Helix auftreten, kommt es zu torsionsbedingten Rotationen der Helix-Enden und zu entsprechenden Verschiebungen der Seitenketten¹. In den globulären Proteinen, z. B. im Myoglobin² und Lysozym³, ist die Polypeptidkette — bedingt durch hydrophobe Seitenkettenbindungen — bekanntlich zu

einem Knäuel zusammengefaltet, so daß die Alpha-Helices in getrennten Abschnitten vorliegen, die durch nicht-helikale Bereiche von einander geschieden sind. Naturgemäß können die Konformationsänderungen, die sich bei einer solchen tertiären Faltung ergeben (z. B. im Lysozym-Molekül⁴), sehr kompliziert sein und werden für jeden Fall speziell

¹ R. JAROSCH, Z. Naturforsch. **24 b**, 672 [1969].

² M. F. PERUTZ, Dansk. Tidsskr. Farm. **38**, 113 [1964].

³ D. C. PHILLIPS et al., Nature [London] **206**, 757, 761 [1965].

⁴ D. M. CHIPMAN and N. SHARON, Science **165**, 454 [1969].