

man in Mischungen von Formamid (Abb. 4) und Methylformamid mit Wasser.

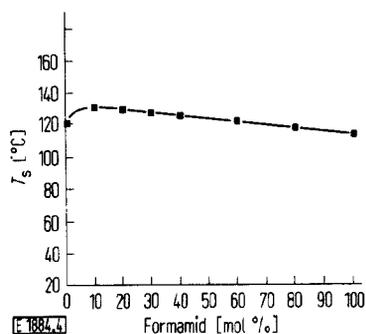


Abb. 4

Kontraktionstemperatur T_s von Keratinfasern (Lincoln-Wolle) in Wasser-Formamid-Mischungen (Aufheizrate: 45°C/Stunde)

Diese Ergebnisse sind unserer Meinung nach ein weiterer Hinweis auf die Existenz und die Bedeutung der hydrophoben Wechselwirkungen für die Stabilisierung der Proteinstruktur. Wesentlich erscheint dabei, daß man hierbei analoge Phänomene wie in konzentrierten Elektrolytlösungen erhält. Sie zeigen, daß die dort beobachteten Effekte kaum auf direkte rein elektrostatische Effekte der Ionen zurückzuführen sind, sondern im wesentlichen auf eine Veränderung der Wasser- bzw. Lösungsmittelstruktur. Sie zeigen ferner, daß man durch gezielte Variation der äußeren Parameter auch an so komplizierten Systemen wie den Keratinfasern Aufschlüsse über die ihren Ordnungsgrad bedingenden zwischenmolekularen Wechselwirkungen erhalten kann.

Wir danken Herrn Prof. Dr. F. H. Müller für die Förderung dieser Arbeiten, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Unterstützung durch Personal- und Sachmittel.

Literatur

- [1] M. Feughelman und T. W. Mitchell, *Biopolymers* 6, 1515 (1968).
- [2] Th. Nemetschek, *Naturwissenschaften* 55, 652 (1968).
- [3] F. H. Müller und H. Martin, *Kolloid-Z., Z. Polymere* 172, 97 (1960).
- [4] H. Martin und F. H. Müller, *Kolloid-Z., Z. Polymere* 191, 1 (1963).
- [5] H. G. Kilian, *Habilitationsschrift* (Marburg 1965).
- [6] G. Ebert und F. H. Müller, *III^{ème} Congrès International de la Recherche Textile Lainière, Paris 1965, IV, 487.*
- [7] F. H. Müller und G. Ebert, *Kalorische Untersuchungen an Wolle, Forschungsbericht des Landes Nordrhein-Westfalen, Opladen 1966.*
- [8] G. Ebert und F. H. Müller, *Kolloid-Z., Z. Polymere* 214, 38 (1966).
- [9] G. Ebert, Ch. Ebert und J. Wendorff, *Kolloid-Z., Z. Polymere* 237, 229 (1970).
- [10] E. Menefee und G. Yee, *Text. Res. J.* 35, 801 (1965).
- [11] J. S. Crighton, F. Happey und J. T. Ball, *Conformation of Biopolymers Teil 2, S. 623, herausgegeben v. G. N. Ramachandran. Academic Press, London 1967.*
- [12] J. S. Crighton und F. Happey, *Symposium on Protein Fibres, Australia 1967, S. 409, Butterworth.*
- [13] H. S. Frank und M. W. Evans, *J. chem. Physics* 13, 507 (1945).
- [14] W. Luck, *Ber. Bunsenges. physik. Chem.* 69, 69 (1965).
- [15] H. G. Hertz, *Ber. Bunsenges. physik. Chem.* 68, 907 (1964).
- [16] R. J. de Sando und G. H. Brown, *J. phys. Chem.* 72, 808 (1968).
- [17] H. L. Schläfer und W. Schaffernicht, *Angew. Chem.* 72, 618 (1960).
- [18] R. Hoyer, persönliche Mitteilung.
- [19] E. Ebert und J. Wendorff, in Vorbereitung.

E 1884

Thermodynamische Untersuchung der Hysterese im System Polyriboadenyl-Polyribouridylsäure — Modell einer makromolekularen Gedächtnis-Aufzeichnung

Von Eberhard Neumann*) und Aharon Katchalsky

Polymer Department, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

(Vorgetragen von E. Neumann anlässlich der 69. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie e.V. am 9. Mai 1970 in Heidelberg)

Bei der Säure-Base-Titration von Komplexen aus Polyriboadenylsäure (Poly A) und Polyribouridylsäure (Poly U) — die als Modellsystem für Ribonucleinsäure (RNA) untersucht wurden — erhält man eine stabile Hystereseschleife als zeitunabhängige Grenzkurve einer Schar von der Titrationsgeschwindigkeit abhängiger kinetischer Kurven. Es wird gezeigt, daß in dem Modellsystem *nur* der helicale Poly (A + 2U)-Tripelstrang (als kooperativ stabilisierter „eindimensionaler Kristall“) Metastabilität entwickeln kann, und daß die Hysterese auf der Existenz von *nur einer* metastabilen Konformation beruht. Das Hystereseverhalten des Modellsystems wird thermodynamisch quantitativ analysiert. Messung und Berechnung ergeben für den bei einem isotherm-isobaren Titrationszyklus auftretenden Verlust an freier Enthalpie, $\Delta G_{irr} = -1.4 (\pm 0.1) \text{ kcal/M(A)}$ und für die Entropieproduktion $\Delta S_{irr} = 4.9 (\pm 0.1) \text{ cal (M(A) grad)}^{-1}$, beide Werte bezogen auf 1 mol Adenylsäure-Monomerrest, bei 20°C. — Die erhaltenen Scanning-Kurven lassen sich mit der Domän-Struktur („Polykristallinität“) des Systems erklären. — Es wird die Möglichkeit angedeutet, wie die Hysterese-Kapazität von RNA-Molekülen mit einer Stufe biologischer Gedächtnisprozesse verknüpft werden kann.

Complexes of polyriboadenylic acid (poly A) and polyribouridyllic acid (poly U) serve as a model system for the hysteretic behavior of ribonucleic acid (RNA). The acid-base titration exhibits a stable hysteresis loop which is the time-independent limit of a series of kinetic curves. It was shown that in the model system only the helical poly (A + 2U) triple strand can develop metastability, and that hysteresis is based on the existence of a single metastable structure. The thermodynamics of an isothermal-isobaric hysteresis cycle was analysed quantitatively. Measurements and calculations yield $\Delta G_{irr} = -1.4 (\pm 0.1) \text{ kcal/M(A)}$ for the loss of Gibbs free energy, and an entropy production of $\Delta S_{irr} = 4.9 (\pm 0.1) \text{ cal (M(A) grad)}^{-1}$, both values per mole of adenylic acid residue at 20°C. — The scanning curves which were obtained can be explained by the domain structure of cooperatively stabilised uni-dimensional polycrystalline regions. — The relation between RNA-hysteresis and possible biological memory records was considered.

*) Max-Planck-Institut für Physikalische Chemie, Göttingen.

I. Einleitung

In Lebewesen vollzieht sich der molekulare Prozeß der Speicherung von Umwelterfahrung wahrscheinlich über mehrere Stufen. In einer kritischen Analyse biochemischer Untersuchungen kommen Roberts und Flexner [1] zu der Schlußfolgerung, daß bestimmte „Gedächtnismechanismen“ eine unmittelbare Biosynthese von Ribonucleinsäure (RNA) und Proteinen ausschließen.

Zahlreich sind die Spekulationen über den molekularen Mechanismus des phänotypischen, operativen Gedächtnisses [2]. Die Frage, wie Umwelterfahrung bleibend molekular niedergelegt wird, ist noch ungelöst.

In einigen Lebewesen sind nach Lernprozessen neu-synthetisierte RNA und Proteine isoliert worden [3]. Aus kinetischen und energetischen Gründen ist es jedoch unwahrscheinlich, daß Umwelteindrücke über Nervenimpulse direkt den Syntheseapparat einer Zelle mobilisieren. Daher sollte eine Zwischenstufe erforderlich sein, in der die externe Information zunächst aufgezeichnet und vorübergehend stabil gespeichert wird.

Der experimentelle Befund, daß die potentiometrische Titration von RNA eine stabile Hystereseschleife ergibt [4–6], initiierte die Idee eines physikalischen Aufzeichnungsmechanismus mit zeitlich begrenzter Speicherung als Basis des kybernetischen Gedächtnisses [7, 8].

Die Funktion von z. B. Tonband und elektronischer Rechenmaschine beruhen auf der Erkenntnis, daß das in der Hystereseschleife reflektierte „Weggedächtnis“ Informationsspeicherung ermöglicht. Das Auftreten des Hysterese-Phänomens ist in hochkooperativen dreidimensionalen Systemen seit langem vertraut, z. B. beim Ferromagnetismus, bei periodischen Schmelz-Erstarungs-Vorgängen von Ammoniumsalzen, bei Deformationszyklen von Gummi oder bei Adsorptionsprozessen [7–10].

Die bemerkenswerte Entdeckung „molekularer Hysterese“ in RNA-Lösungen eröffnet im Prinzip eine Möglichkeit, auf molekularer Ebene Information niederzulegen. Der vorgeschlagene physikalische Aufzeichnungsprozeß beinhaltet allgemein kooperative Strukturumwandlungen, Konformationsänderungen von Biopolymeren, z. B. RNA-Makromolekülen [7, 8].

Bei der potentiometrischen Titration von RNA-Lösungen beobachtet man in einem bestimmten pH-Bereich „Scanning-Kurven“ [6] – siehe Abb. 1 –, die denjenigen ähnlich sind, die man bei Magnetisierungs-Entmagnetisierungs- und Adsorptions-Desorptionszyklen erhält [9, 10]. Diese innerhalb der Hauptschleife möglichen „Abtast-Kurven“ spiegeln den Durchlauf durch bestimmte Zwischenzustände eines polymikrokristallinen Systems.

Die Mikrokristallite bilden die System-Untereinheiten oder Domänen, die im einfachsten Fall in zwei Alternativstrukturen auftreten. Die jeweilige Struktur und Größe einer Domäne sowie die räumliche Verteilung dieser Domänen sind topologische Variable eines Domänensystems. Die Scanning-Kurven sollten Aufschluß über diese „innere Topologie“ liefern.

Das Auftreten von Scanning-Kurven bei RNA charakterisiert das Makromolekül als ein Multi-Domänensystem. Wenn

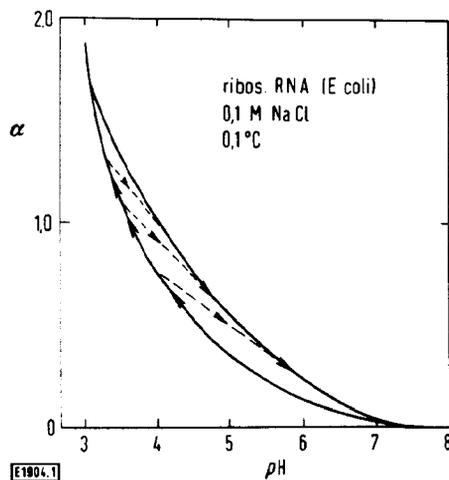


Abb. 1

Potentiometrische Titration ribosomaler RNA, halbschematisch nach Cox [6]; Protonierungsgrad α als Funktion des pH-Werts. Hystereseschleife (voll ausgezogen): Säuretitation von pH 8 bis pH 3 und anschließende Basetitration von pH 3 bis pH 8; Scanning-Kurven (gestrichelt), z. B. Säuretitation von pH 8 bis pH 4 und anschließende Basetitration von pH 4 bis pH 8

man die Domänen als die Symbole einer Schrift betrachtet, dann enthält der Scanning-Prozeß die prinzipielle Möglichkeit, diese Schrift zu dekodifizieren. Die Schrift selbst beinhaltet bestimmte Kombinationen der Systemdomänen, physikalisch durch die Verteilungen der Domänggröße und -konformation realisiert.

Im folgenden wird zunächst versucht, den dem Hystereseverhalten eines RNA-Modellsystems zugrunde liegenden molekularen Mechanismus zu analysieren. Es wird u. a. gezeigt, wie die einen Hysteresezyklus im Modellsystem begleitende „Entropieproduktion“ spezifischen, spontan ablaufenden Reaktionen quantitativ zugeordnet werden kann.

II. Hysterese und Metastabilität

Für eine theoretische Interpretation des Hysterese-Phänomens wird allgemein die Existenz von metastabilen Zuständen postuliert. Demnach verursachen Metastabilitäten in den Mikrostrukturen die makroskopische Hystereseschleife eines Domänensystems.

Phänomenologisch wird eine Einzeldomäne des Systems unter Verwendung geeigneter Parameter durch eine Zustandsfunktion vom van der Waals-Typ beschrieben, wie in Abb. 2 schematisiert. Zwischen den stabilen Ästen der Zustandskurve für die Alternativzustände I und II befindet sich ein nichtrealisierbarer Instabilitätsbereich. An der Stelle $x(B)$ erfolgt der Gleichgewichtsübergang von I nach II und umgekehrt ($I \rightleftharpoons II$). In bestimmten Fällen läßt sich der Wert von $x(B)$ über das „Flächengleichheits-Theorem“ bestimmen.

Im allgemeinen sind Phasenumwandlungen mit der Überwindung von Energiebarrieren (Nucleations- und/oder Propagationshemmungen) verbunden. Um Gleichgewichtsumwandlungen zu realisieren, müssen diese Barrieren verkleinert werden, z. B. es müssen Keimbildungszentren geschaffen werden. Falls dies unter gegebenen Bedingungen nicht möglich ist, weicht das System in metastabile Bereiche aus.

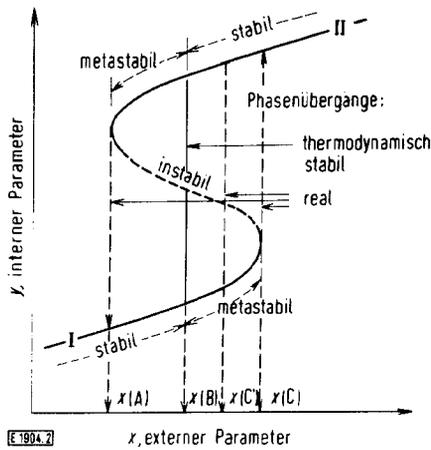


Abb. 2

Schematische Darstellung einer Phasenumwandlung: Bereiche stabiler Zustände, I und II; Metastabilitäts- und Instabilitätsbereiche. Interner (extensiver) Parameter, z. B. Volumen; externer (intensiver) Parameter, z. B. Temperatur

Existieren genügend hohe Energiebarrieren*), so ist es möglich, daß sich ausgeprägte langlebige Metastabilitäten entwickeln. Die metastabilen Zustände brechen an den Operationspunkten $x(C)$, für den Übergang $I \rightarrow II$, und $x(A)$ für $II \rightarrow I$ abrupt zusammen. Die spontanen Nichtgleichgewichtsübergänge können, wenn die metastabilen Zustände schon vor dem Erreichen der Grenzpunkte instabil werden, auch an Zwischenpunkten innerhalb der Metastabilitätsbereiche erfolgen; z. B. bei $x(C)$ für $I \rightarrow II$. Für stabile, reproduzierbare Hysteresen sollten jedoch charakteristische, reproduzierbare Werte für die Operationspunkte der Domänen existieren.

Endliche Verteilungen der Operationspunkte in einem System von Domänen unterschiedlicher Größe und Stabilität sind die Ursache für das Auftreten von Scanning-Kurven. Nach Everett [10] sollte eine begrenzte Anzahl experimenteller Scanning-Kurven die Bestimmung der „Gedächtnisfunktion“ des Hystereseystems ermöglichen. Die Kenntnis dieser von der Verteilung der Domänen abhängigen Funktion gestattet eine vollständige Berechnung des Hystereseverhaltens eines Systems.

In der Theorie der Phasenumwandlungen existieren in Verbindung mit dem Auftreten von Metastabilität und Hysterese einige konzeptionelle Schwierigkeiten [11]. Für den Grenzfall, daß in den Metastabilitätsbereichen der Domänen die Übergangswahrscheinlichkeiten äußerst klein werden, sind die metastabilen Zustände, obwohl irreversibler Natur, praktisch zeitunabhängig; die Hysterese Schleife des Systems ist damit „statisch“ und stabil.

Die Zeitunabhängigkeit metastabiler Zustände gestattet es, thermodynamische Zustandsgrößen in gleicher Weise zu verwenden wie bei echten Gleichgewichtszuständen.

Das Auftreten von Hysterese ist nicht an die Bedingung geknüpft, daß für beide Alternativzustände metastabile Bereiche existieren. Es ist ausreichend, wenn nur eine Strukturform Metastabilität entwickeln kann [9].

*) Everett und Whitton [9] demonstrieren mit einem magneto-mechanischen Modell in einfacher Weise, wie auf Grund unsymmetrischer Potential-Abstandsfunktionen hohe Energiebarrieren entstehen und umgangen werden können.

In dem Bereich zwischen den Operationspunkten einer Domäne ist das Weggedächtnis „lokalisiert“. In diesem „Gedächtnisbereich“ ist der interne Parameter y keine eindeutige Funktion des externen Parameters x (Abb. 2). In Abhängigkeit von der Prozeß-Vorgeschichte ansteigender oder fallender x -Werte sind jedem Wert von x , $x(II \rightarrow I) < x < x(I \rightarrow II)$, zwei Werte für $y(x)$ zugeordnet: $y(I, x)$ auf dem unteren Ast und $y(II, x)$ auf dem oberen Ast der Zustandsfunktion.

Das Ansteigen der Entropie, welches die irreversiblen Phasenübergänge begleitet, legt eine Umlaufrichtung für die Prozesse fest. Der Umlaufrichtung ist ein Zirkulationsvektor zugeordnet, welcher eine auf Hysterese basierende, irreversibel-oszillatorische Eigenschaft des Systems beschreibt [8].

III. Modellsystem

Die komplizierte Primärstruktur natürlicher Ribonucleinsäuren erschwert eine quantitative Analyse physikalisch-chemischer Meßergebnisse erheblich. Jedoch sind konformative Strukturen und physikalisch-chemisches Verhalten von RNA verständlich, wenn man die Eigenschaften von einfachen synthetischen Polynucleotiden untersucht [12].

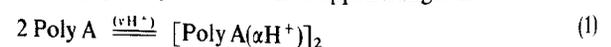
Der bei der potentiometrischen Titration von RNA-Lösungen gefundene Hysteresebereich befindet sich in der Nähe eines pK -Werts von Adenosin-Monophosphat (AMP): $pK(5'-AMP) = 3,7$ bei $25^\circ C$ und der Ionenstärke Null [13]. Zusammengesehen mit der Tatsache, daß in natürlicher RNA die Basen Adenin und Uracil häufig vorkommen und leicht assoziieren [12], liegt es nahe, die Kombination von Polyribonucleinsäure (Poly A) und Polyribouridylsäure (Poly U) als Modellsystem zu verwenden [5, 7].

In diesem RNA-Modellsystem sollten Polynucleotide gleichen Polymerisationsgrades (in ihren Komplexen) den Einzeldomänen entsprechen. Ein Gemisch von Polymeren breiterer Molekulargewichtsverteilung repräsentiert ein Multi-Domänensystem.

In einer Mischung von Poly A und Poly U im Molverhältnis 1 : 1 sind von $Co x$ bei spektrophotometrischen Titrationen Hysteresekurven erhalten und mit Hilfe eines Phasendiagramms gedeutet worden [5, 7].

Die im Modellsystem der Polyelektrolyten Poly A und Poly U möglichen RNA-analogen konformativen Strukturtypen sind in wäßrigen Salzlösungen durch bestimmte Werte des Mischungsverhältnisses der Polymeren, der Temperatur, der Salzkonzentration und des pH festgelegt (Phasendiagramm) [14].

Während nun gelöstes Poly U in weiten Grenzen von Temperatur, pH und Ionenstärke in der statistisch ungeordneten Knäuelform vorliegt, zeigt Poly A mehrere Typen von Sekundärstruktur [12]. Das bei Raumtemperatur weitgehend im Einzelstrang helical gestapelte Poly A bildet im sauren pH -Bereich einen doppelhelicalen Komplex aus parallel angeordneten partiell protonierten Einzelsträngen [15, 16]. Das Bildungsgleichgewicht dieses Doppelstranges ist:



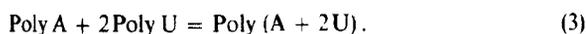
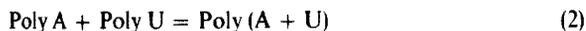
unter der Annahme gleichen Polymerisationsgrades P für die

Polynucleotide: α ist der Protonierungs- bzw. Ionisationsgrad, und $\nu = \alpha P$ ist die Anzahl Protonen pro Polymer.

Der Ringstickstoff N-1 der Adeninbase ist im pH-Bereich von 3 bis 7 der hauptsächlichste Protonenakzeptor [15, 13].

Bei neutralem pH und Raumtemperatur assoziieren Poly A und Poly U bei geeigneter Salzkonzentration je nach Mischungsverhältnis der Polymeren 1:1 oder 1:2 zu helicalen doppelsträngigen oder tripelsträngigen Komplexen [17, 18, 12]. In diesen Komplexen sind die heterozyklischen Basen über Wasserstoff-Brückenbindungen spezifisch zugeordnet und regelmäßig aufeinandergestapelt (stacking). (Die kooperativ stabilisierten Systeme ähneln daher „eindimensionalen Kristallen“.)

Die Bildungsreaktionen der Komplexe sind formal:



Aus Gründen der chemischen [19] und konformativen Stabilität [20, 15] und der Reaktionskinetik [21] wird als Lösungsmittel für die Polymeren 0,1 M NaCl-Lösung verwendet.

IV. Experimenteller Teil

1. Modellsubstanzen

Die verwendeten Polymeren Poly A (K-Salz) und Poly U (NH₄-Salz) sind Produkte von Miles, Elkhart, USA. Als Polyribonucleotide sind beide Substanzen hochempfindlich gegen Ribonuclease-Einwirkung und bakterielle Zersetzung. Daher wurden für die Reinigung der Polymeren durch Phenol-Extraktion, Macaloid-Behandlung und Dialysen, für die Vorbereitung und Lagerung der Lösungen und während der teilweise langwierigen Messungen sorgfältig sterile Bedingungen eingehalten [19, 22, 24]. Alle Lösungen sind durch Millipore-Filter (0,45 μ) gefiltert und bei 0°C aufbewahrt worden.

Ein Teil der Polymeren wurde unter „Theta-Punkt-Bedingungen“ fraktioniert [23, 24] und die hochpolymeren Anteile ausgewählt [22].

Die Konzentrationen der Polymeren werden in Molen der jeweiligen Kettenglieder (pro Liter Lösung) angegeben (z. B. $M(A)$ für den Adenylsäurerest, $M(A + U)$ und $M(A + 2U)$ für das Basenpaar (A + U) bzw. (A + 2U)-Basentripel) und spektrophotometrisch mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten bestimmt [12, 21, 22].

In 0,1 M NaCl-, 0,005 M Na-Phosphatlösungen, pH 7,1 und 20°C sind die Extinktionskoeffizienten bei der Wellenlänge $\lambda = 260 \mu\text{m}$ für Poly A: $\epsilon = 9,45 \cdot 10^3 (M(A)\text{cm})^{-1}$, (ϵ_3); Poly U: $\epsilon = 9,5 \cdot 10^3 (M(U)\text{cm})^{-1}$, (ϵ_4); Poly (A + U): $\epsilon = 13,64 \cdot 10^3 (M(A + U)\text{cm})^{-1}$, (ϵ_2); Poly (A + 2U): $\epsilon = 17,35 \cdot 10^3 (M(A + 2U)\text{cm})^{-1}$, (ϵ_1); und für Poly A zwischen pH 5,5 und 3,2: $\epsilon = 7,03 \cdot 10^3 (M(A\alpha H^+)\text{cm})^{-1}$, (ϵ_3).

Die Konzentration an Neutralsalz, NaCl, ist 0,1 M. Die zu den spektrophotometrischen Titrationsen verwendeten Lösungen sind schwach gepuffert. Sie enthalten zusätzlich 0,005 M Na-Phosphat [13], so daß zu Beginn der Messungen pH = 7,1.

Die Lösungen der Komplexe Poly(A + U) und Poly(A + 2U) werden durch Mischung der Polymeren im Molverhältnis 1:1 bzw. 1:2 erhalten. Diese Lösungen werden vor den Messungen 3 bis 4 Wochen gelagert, um vollständige Komplexbildung zu gewährleisten [21].

Zum Vergleich – siehe V. – werden Lösungen in der Weise hergestellt, daß Lösungen der Polymeren getrennt erst auf pH 3,3 eingestellt und dann gemischt werden.

2. Apparatur und Meßgrößen

Die Titrationsen werden mit 0,1 N Salzsäure und 0,1 N Natriumhydroxid (beide Titrierlösungen sind 0,1 M NaCl) mit Hilfe von Agla-Mikrometern ausgeführt (Genauigkeit der Volumenänderung: $\pm 0,05 \mu\text{l}$). Die pH-Messungen werden mit dem pH-Meter E 388.

Metrohm (Schweiz) und den Radiometer (Copenhagen)-Elektroden G 202 B und K 401 durchgeführt. Die Eichung im pH-Bereich 2,0 bis 7,0 erfolgt mit Standardpuffern [13]. Die Temperatur wird mit Thermostaten auf 0,1°C genau geregelt. Gereinigter Stickstoff wird langsam über die Titrierlösungen geblasen.

Die potentiometrischen Titrationsen werden mit 3,0 cm³ der Meßlösungen begonnen und Polymer- und polymerfreie Vergleichslösungen unter gleichen Bedingungen titriert.

Der Protonierungsgrad α des Modellsystems ist als Mol gebundener Protonen pro Mol Kettenglied (hier der Adenylsäurerest, siehe VI.) definiert. Aus dieser Definition folgt eine Beziehung, mit der α aus der pH-Wertdifferenz von Meß- und Vergleichslösung bei gleichen Volumina und unter Berücksichtigung der jeweiligen Aktivitätskoeffizienten berechnet werden kann [25, 26].

Die spektrophotometrischen Titrationsen werden mit Hilfe eines Spektrophotometers (Zeiss, PMQ II) durchgeführt, dessen thermostatischer Küvettenhalter (mit magnetischer Rührvorrichtung) geringfügig modifiziert wird. Die Elektroden werden über ein geeignet geschnittenes Plexiglasstück an den Küvettenhalter geklemmt und tauchen in eine 2 x 2 x 5 cm Quarzküvette. Diese Anordnung erlaubt eine kontinuierliche Bestimmung der optischen Dichte (O. D.) oder Absorption als Funktion des pH, relativ zu einer Vergleichslösung bei bestimmter Temperatur und Wellenlänge.

Die Titrationsen werden mit 7,5 cm³ Lösung begonnen, die auftretenden Verdünnungen bei der Angabe der O. D. berücksichtigt.

Kooperative Strukturänderungen in Polynucleotidsystemen machen sich in auffallenden Änderungen der Ultraviolett-Absorption bei bestimmten Wellenlängen in relativ eng begrenzten Temperatur- oder pH-Bereichen bemerkbar. Dabei wird angenommen, daß die Änderung der optischen Dichte im Umwandlungsbereich das Ausmaß der Umwandlungsreaktion widerspiegelt. Die Temperatur (oder der pH-Wert), bei der die optische Dichte die Hälfte der Gesamtänderung erreicht (die Strukturänderung als bis zur Hälfte fortgeschritten angenommen wird), heißt Umwandlungstemperatur T_m (bzw. Umwandlungs-pH-Wert, pH_m). Trotz endlicher Umwandlungsbreite werden Strukturübergänge, wie z. B. Helix-Knäuel-Umwandlungen, thermodynamisch analog Phasenumwandlungen erster Ordnung behandelt, und der T_m -Wert oder der pH_m -Wert gelten als charakteristische Parameter.

Die Messung der optischen Dichte bei 260 m μ ist geeignet, ange-nähert das Ausmaß von Reaktionen zu messen, bei denen der Uridylsäurerest des statistisch geknäuelten Poly U in den Doppel- bzw. Tripelstrangkomplexen mit Poly A inkorporiert wird [21].

V. Meßergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse potentiometrischer und spektrophotometrischer Titrationsen im System Poly A–Poly U sind in den Abb. 3 bis 6 ausschnittsweise (zwischen pH 3 und 7) dargestellt. In Abb. 3 zeigt Kurve A die pH-Abhängigkeit des Protonierungsgrades einer Poly A-Lösung. Der steile Anstieg bei etwa pH 5,9 wird der Doppelstrangbildung aus Poly A-Einzelsträngen nach Gleichung (1) zugeordnet [12, 16]. Die Komplexbildung erfolgt schon bei relativ niedrigem α . Der partiell protonierte Doppelstrang nimmt bei pH-Erniedrigung kontinuierlich Protonen auf. Kürzlich durchgeführte Röntgen-Strukturanalysen an Poly A-Gelen verschiedenen pH-Werts zeigen, daß der Doppelstrang bei pH 5,9 zunächst den Strukturtyp B bildet. Die weitere Protonierung wandelt die B-Form in die stabilere A-Form um [27]. Die Strukturumwandlungen im System Poly A sind reversibel [12].

Im Gegensatz zu Poly A erhält man bei der Säure-Base-Titration einer Poly (A + 2U)-Lösung eine Hystereseschleife. Während eine Poly U-Lösung im pH-Bereich zwischen 3 und 7 keine merkliche Protonenaufnahme zeigt, hat die Komplexbildung von Poly A und Poly U zu Poly (A + 2U) zur Folge,

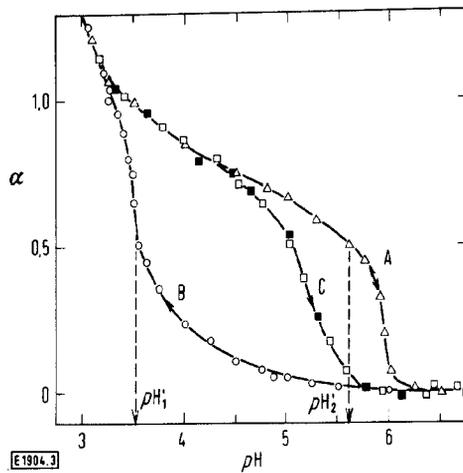


Abb. 3

Potentiometrische Titrations (Protonierungsgrad α als Funktion des pH-Werts) bei 20°C: a) einer 0,1 M NaCl-Lösung von (fraktioniertem hochmolekularem) Poly A und Poly U (gemischt im Molverhältnis der Polymeren von 1:2), \circ : Säuretitration (Kurve B), \square anschließende Basetitration (Kurve C), b) einer 0,1 M NaCl-Lösung von Poly A, \triangle (Kurve A). Polymerkonzentrationen bei Titrationsbeginn, pH 7:

$$a) c = 3,24 \cdot 10^{-4} \text{ M (A + 2U)}, \quad b) c = 3,2 \cdot 10^{-4} \text{ M (A)}$$

daß die Säuretitration ausgehend von pH 7 längs der Kurve B verläuft. Der „Baseast“ ist zwischen pH 3 und 4,5 identisch mit der Titrationskurve der Poly A-Lösung. Für $\text{pH} \geq 4,5$ ist der gezeigte Basearm C die zeitunabhängige Grenzkurve einer Schar von „kinetischen Kurven“ (s. auch Abb. 5).

Der Säure-Basezyklus kann in einer Poly (A + 2U)-Lösung beliebig oft wiederholt, die Hystereseschleife zyklisch „umlaufen“ werden.

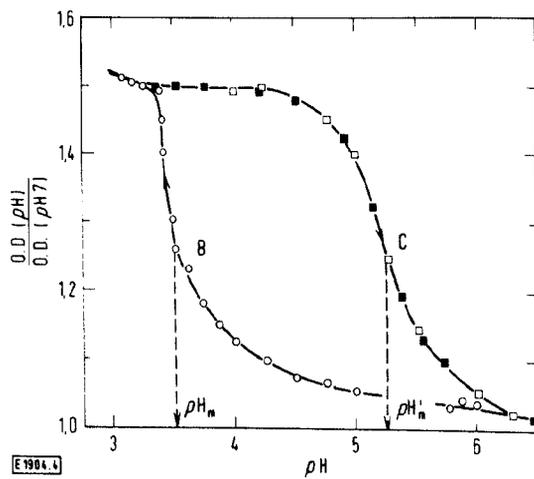


Abb. 4

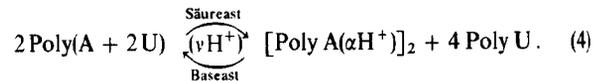
Spektrophotometrische Titration einer 0,1 M NaCl-Lösung von (fraktioniertem hochmolekularem) Poly A und Poly U (1:2) bei 20°C (relative optische Dichte O.D. (pH), bezogen auf O.D. (pH 7) als Funktion des pH-Werts).

- a) Säure (\circ)-Base (\square)-Titrationszyklus,
b) Basetitration (\blacksquare) einer Mischung von Poly A (pH 3,3) mit Poly U (pH 3,3), 1:2.

Polymerkonzentrationen bei Titrationsbeginn:

- a) $c = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M (A + 2U)}$,
b) $c(\text{A}) = 3,1 \cdot 10^{-5} \text{ M (A)}$ und $c(\text{U}) = 6,0 \cdot 10^{-5} \text{ M (U)}$ vor der Mischung gleicher Volumina zur Lösung für die Basetitration

Der Anstieg der optischen Dichte bei 260 m μ einer Poly (A + 2U)-Lösung (Abb. 4) während der Säuretitration entspricht der Entkopplung von Uridylsäureresten aus dem Stacking-Verband der Tripelhelix. Die Erniedrigung der relativen optischen Dichte bei der Basetitration zeigt fortschreitende Bildung von (A + 2U)-Sequenzen an. Die Abb. 3 und 4 enthalten Meßpunkte einer Basetitration einer Mischung, bei der die Lösungen von Poly A bzw. Poly U zuerst auf pH 3,3 eingestellt und erst dann gemischt wurden. Die erhaltenen Titrationskurven sind identisch mit den Basenästen der Hystereseschleifen einer Poly (A + 2U)-Lösung. Danach läßt sich der Hysteresesyklus in diesem System formal nach Gleichung (4) beschreiben.



Die Pfeile sollen „verschiedene Wege“ bei der Säure-Base-Titration andeuten.

Die in den Änderungen der optischen Eigenschaften reflektierten Konformationsänderungen sind durch die pH_m -Werte charakterisiert. Der Umwandlung des bei pH 7 gebildeten Tripelstranges in die Poly A-Doppelhelix ist der Umwandlungsmittelpunkt pH_m zugeordnet. Die „Rückbildung“ von Poly (A + 2U) aus $[\text{Poly A}(\alpha\text{H}^+)]_2$ und Poly U ist durch $\text{pH}'_m (> \text{pH}_m)$ gekennzeichnet.

Die Säure-Base-Titrations einer Lösung von Poly A und Poly U im Mischverhältnis der Polymeren 1:1 ergeben kompliziertere Bilder.

Die Säuretitration von Poly (A + U), Abb. 5, verläuft über zwei relativ ausgeprägte Stufen. Spektrophotometrische Untersuchungen des thermischen Verhaltens von Poly (A + U) bei Salzkonzentrationen zwischen 0,01 und 0,1 M (NaCl) ergeben, daß das System bei saurem pH nach Gleichung (5) reagieren kann [14, 28].

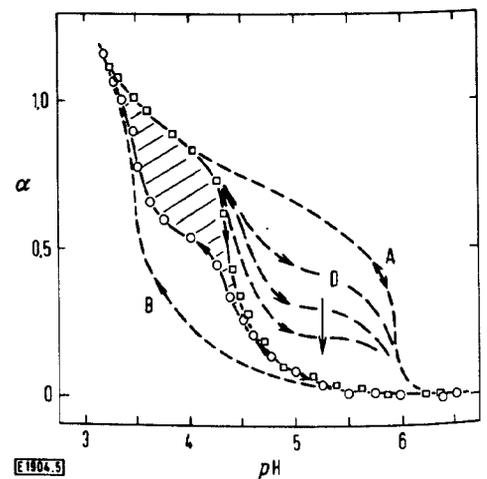
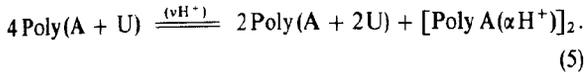


Abb. 5

Potentiometrische Titration einer 0,1 M NaCl-Lösung von (fraktioniertem, hochmolekularem) Poly A und Poly U (gemischt im Molverhältnis der Polymeren von 1:1), bei 20°C (Protonierungsgrad α als Funktion des pH-Werts). \circ , Säuretitration und \square , Basetitration. Polymerkonzentration bei Titrationsbeginn, pH 7: $c = 3,25 \cdot 10^{-4} \text{ M (A + U)}$.

Kurvenschar D: „kinetische“ Kurven (senkrechter Pfeil zeigt in Richtung fallender Titrationsgeschwindigkeit). Zum Vgl., Titrationskurven von Poly A, Kurve A und von Poly (A + 2U), Kurve B



„Strang-Disproportionierungsreaktionen“ sind in diesem System zuerst während thermischer Strukturumwandlungen bei pH 7 gefunden worden [20].

Der ersten Stufe der isothermen Säuretitration von Poly(A + U) läßt sich die in Gleichung (5) formulierte Reaktion zuordnen. In der zweiten Stufe reagiert das System dann nach Gleichung (4).

Der Basetest des Titrationszyklus koinzidiert zwischen pH 3 und 4,5 mit der Titrationskurve von Poly A (Kurve A). Der weitere Verlauf der Titration mit Base ist ähnlich wie im System Poly(A + 2U) stark zeitabhängig.

Bei einer „Titrationsgeschwindigkeit“ von etwa einer pH-Einheit pro Stunde mißt man die zweistufige Kurve D. Bei Verringerung der Titrationsgeschwindigkeit erhält man schließlich eine stabile „statische“ Grenzkurve, die bei höheren pH-Werten mit der ersten Stufe der Säuretitration zusammenfällt.

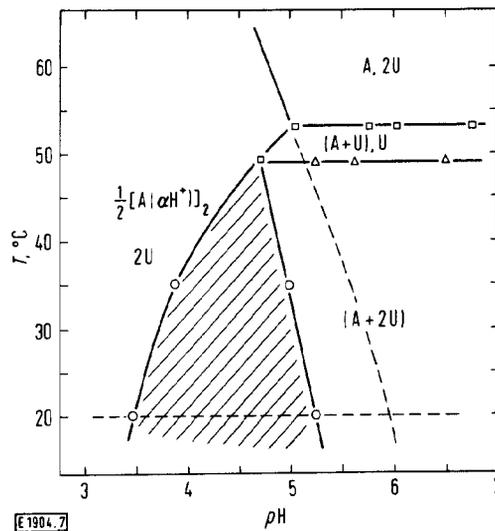
In den „kinetischen“ Kurven der Kurvenschar D reflektiert die erste Stufe bei niedrigen pH-Werten die Bildung von (A + 2U)- und (A + U)-Sequenzen. Die zweite Stufe bei höherem pH ist durch das „restliche“ $[\text{Poly } A(\alpha H^+)]_2$ verursacht. Es ist bekannt, daß die Bildung von A-U-Komplexen bei pH 7 durch Mischung von Poly A und Poly U (1 : 1) sehr langsam erfolgt und zunächst überwiegend Poly(A + 2U) ergibt. Die angekoppelte „Ausheilung“ zu Poly(A + U) ist extrem langsam [21].

Die in Abb. 6 dargestellten Ergebnisse spektrophotometrischer Titrations und ein Vergleich der Extinktionskoeffizienten (siehe IV., 1.) der in den Gleichungen (4) und (5) angegebenen Reaktionspartner führen zu einer mit den potentiometrischen Resultaten konsistenten Deutung des Titrationszyklus.

Die Größe und der pH-Bereich der Hystereseschleifen in dem Modellsystem sind abhängig von der Temperatur und der Ionenstärke. Werden die Titrations z. B. bei 35°C, bei

gleicher Polynucleotid- und NaCl-Konzentration der Lösungen ausgeführt, ergeben sich kleinere Hysteresebereiche.

Die Temperatur- und pH-Abhängigkeit der im System Poly A-Poly U (1 : 2) möglichen stabilen Strukturtypen ist durch das „Phasendiagramm“ in Abb. 7 veranschaulicht.



[E1904.7]

Abb. 7

„Phasendiagramm“ des Systems Poly A-Poly U (1 : 2), Salzkonzentration 0,1 M (NaCl); Abhängigkeit der Strukturtypen des Systems von Temperatur und pH-Wert.

\square, Δ : T_m -Werte thermischer Umwandlungen bei konstantem pH-Wert [14].

\circ : pH_m -Werte isothermer Strukturumwandlungen; gestrichelte Kurve: pH_m -Werte der Helix-Knäuel-Umwandlung von Poly A, Gleichung (1)

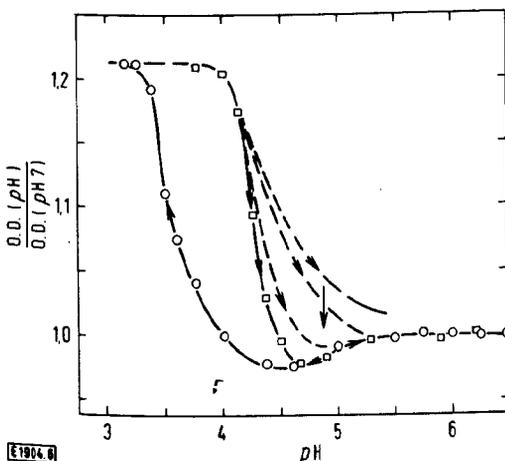
Die Existenzbereiche der verschiedenen Strukturen sind durch die ausgezogenen Kurven voneinander abgegrenzt. Diese Kurven verbinden die Umwandlungsmittelpunkte von Strukturübergangsbereichen endlicher Breite.

Die isotherme Säure-Base-Titration des bei pH 7 gebildeten Poly(A + 2U) bei z. B. 20°C ordnet sich in dieses Diagramm so ein, daß bei pH-Erniedrigung der Tripelstrang im Bereich von $pH_m = 5,25$ in das schraffiert gezeichnete Hysteresefeld „eintritt“ und bei $pH_m \approx 3,50$ in die $[\text{Poly } A(\alpha H^+)]_2$ -Doppelhelix und freies Poly U dissoziiert. Bei der anschließenden Basetitration bildet sich die Ausgangsstruktur Poly(A + 2U) nicht bei pH_m zurück, sondern erst bei pH_m nach dem Durchlauf durch das Hysteresefeld. In diesem Hysteresebereich finden wir somit je nach Titrations-„Vorgeschichte“ entweder den Mehrstrang-Komplex Poly(A + 2U) oder $[\text{Poly } A(\alpha H^+)]_2$.

Beide helicalen Strukturen werden durch höhere Temperaturen destabilisiert: Poly(A + 2U) dissoziiert schon bei höherem pH, während $[\text{Poly } A(\alpha H^+)]_2$ schon bei niedrigem pH instabil wird. Schließlich bei 50°C tritt keine Hysterese mehr auf.

Die Polyelektrolytnatur der Polymeren bedingt, daß die Stabilität der Mehrstrang-Komplexe von der Ionenstärke der Lösung abhängt. So verschiebt eine Erniedrigung der Salzkonzentration das Hysteresefeld im wesentlichen zu höheren pH-Werten.

Die Analyse der in den Abb. 5 und 6 dargestellten Ergebnisse und des Phasendiagramms in Abb. 7 (und auch der



[E1904.6]

Abb. 6

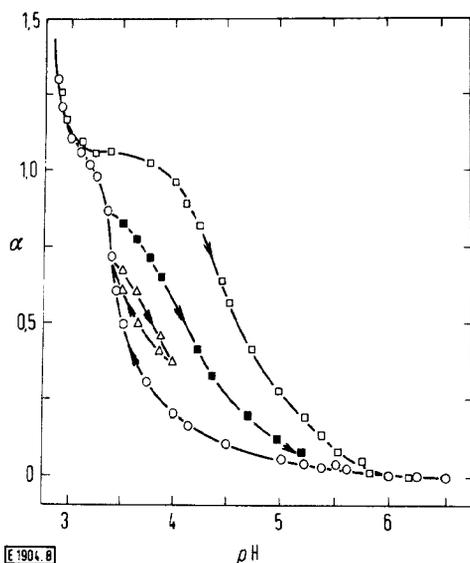
Spektrophotometrische Titration einer 0,1 M NaCl, 0,005 M Na-Phosphat-Lösung (relative optische Dichte O.D. (pH), bezogen auf O.D. (pH 7) als Funktion des pH-Werts).

a) Säure (\circ)-Base (\square)-Titrationszyklus.

Polymerkonzentration bei Titrationsbeginn, pH 7,1: $c = 1,49 \cdot 10^{-5}$ M (A + U). (Vgl. Abb. 5.)

Resultate von Massoulié [14] und Clauwaert [28]) führt uns zur Schlußfolgerung, daß in weiten Grenzen der Ionenstärke – 0,01 bis 1 M (NaCl) – und Temperatur *nur* der tripelstrangige Komplex Poly(A + 2U) bei der Säure-Base-Titration eine Hystereseschleife ergibt. Dieses Resultat ist verschieden von den Ergebnissen, die Cox [5] erhalten hat.

Mit einer Lösung von Poly A und Poly U (1 : 2) breiterer Molekulargewichtsverteilung werden besonders ausgeprägte Scanning-Kurven gemessen; siehe Abb. 8, z. B. Säuretitration



E 1904. 8

Abb. 8

Potentiometrische Titrations einer 0,1 M NaCl-Lösung (bei 20°C) von Poly A und Poly U breiterer Molekulargewichtsverteilung. Scanning-Kurven, siehe Text

ausgehend von pH 7 bis pH 3,4; anschließend Basetitration von pH 3,4 bis pH 4 gefolgt von der Säuretitration von pH 4, über pH 3,4 (Scanning-Schleife) längs der Grenzkurve bis pH 3 und anschließende Basetitration von pH 3 bis pH 7.

Die Analyse des Scanning-Verhaltens, die zur Bestimmung der „Gedächtnisfunktion“ [10] des Systems führt, erfolgt in einer in Vorbereitung befindlichen Arbeit [22].

VI. Thermodynamische Analyse

Anfangs- und Endzustand des Hysteresezyklus im System Poly A-Poly U (1 : 2) sind durch die Umsatzgleichung (4) beschreibbar. Die während der Säure-Base-Titration stattfindenden Reaktionen basieren jedoch auf den Elementarprozessen der reagierenden Kettenglieder (oder der Reaktion geschlossener Sequenzen von nahezu gleichzeitig kooperativ agierender Nucleotidreste). Die Aktivitäten der Ketten-Untereinheiten werden daher das Reaktionsverhalten der Polymeren bestimmen.

Theoretische [30] und experimentelle [31] Untersuchungen von kooperativen Reaktionen zwischen hochpolymeren Polynucleotiden (Helix-Knäuel-Umwandlungen oder konformativen Übergängen, die zur Änderung des Helixtyps führen) zeigen, daß auftretende Konzentrationsabhängigkeiten vernachlässigbar klein sind. Aus Meßwerten lassen sich daher unmittelbar die mittleren, auf 1 Mol reagierende Ketteneinheit bezogenen Konformationsanteile als relative partielle Zustandsparameter angeben [31].

1. Phänomenologische Beschreibung

Die molekulare Interpretation des hysteretischen Verhaltens des Systems Poly A-Poly U (1 : 2) während der Säure-Base-Titration orientiert sich zunächst an den in den Abb. 5 und 6 gezeigten Ergebnissen. Danach erscheint die in Gleichung (5) beschriebene Reaktion reversibel zu sein. Daher nehmen wir an, daß die Wechselwirkung von [Poly A(αH^+)]₂ mit Poly U eine Gleichgewichtsreaktion ist. Sie führt bei niedrigen pH-Werten unabhängig vom Mischungsverhältnis der Polymeren aus energetischen Gründen zunächst überwiegend zu tripelstrangigen (A + 2U)-Sequenzen.

Der Gleichgewichtszustand ist pH-abhängig (vgl. [29, 14]). Bei pH 3,3 führt die Mischung von Lösungen des [Poly A(αH^+)]₂ mit Poly U zu keiner merklichen Tripelstrangbildung (<0,5%); während 6-monatiger Beobachtungszeit mißt man keine Änderung der optischen Dichte der Lösung.

In Abb. 3 folgt der gemessene Protonierungsgrad $\alpha_{(A+2U)}$ des Systems Poly (A + 2U) bis etwa $\alpha_1 = 0,55$ der Beziehung

$$pH = pK'_1 + \lg \frac{1-\alpha_1}{\alpha_1} \quad (6)$$

Im gleichen pH-Bereich ist der Anstieg des Protonierungsgrads mit einem Ansteigen der optischen Dichte verbunden; Abb. 4. Daher wird die Säuretitration des Poly (A + 2U),



zunächst als eine reversible Kopplung des Helix-Knäuel-Gleichgewichts



mit dem Protonierungsgleichgewicht



von Segmenten des tripelstrangigen Makromoleküls betrachtet. K'_1 ist die der Reaktion nach Gleichung (9) zugeordnete scheinbare Dissoziationskonstante und α_1 der Protonierungsgrad des A-Segments.

Auch die Ähnlichkeit von $pK'_1 = 3,52$ mit $pK(S'-AMP) = 3,7$ deutet an, daß sich die protonierten A-Kettenglieder wahrscheinlich nicht (abgeschirmt) in helicalen (A + 2U)-Sequenzen, sondern in aufgeknäuelten „freien Enden“ und in Knäuelbereichen („Loops“) zwischen zwei Helixsequenzen des Tripelstranges befinden. (Da die tripelhelicale Konformation des Poly (A + 2U) durch kooperative Wechselwirkungen stabilisiert wird, ist jedoch nur bei sehr langkettigen Polymerkomplexen eine größere Wahrscheinlichkeit für Loops zu erwarten.)

Bei pH-Erniedrigung erfolgt die Verschiebung des in Gleichung (7) formulierten Gleichgewichts in einem pH-Bereich, in welchem [A(αH^+)]₂-Assoziate die thermodynamisch stabile Nucleotidkombination ist. Diese Situation wird durch ein Zustandsdiagramm anschaulich verdeutlicht.

In Abb. 9 (oberer Teil) ist das mittlere chemische Potential $\bar{\mu}^0(A)$ des A-Segments (Standardwert) in drei verschiedenen Konformationstypen als Funktion des pH-Werts aufgetragen: Zustand I, tripelstrangiges Poly (A + 2U); II, doppelhelicales [Poly A(αH^+)]₂; III, einzelstrangiges Poly A als Referenzzustand, $\bar{\mu}^0(III) = 0$.

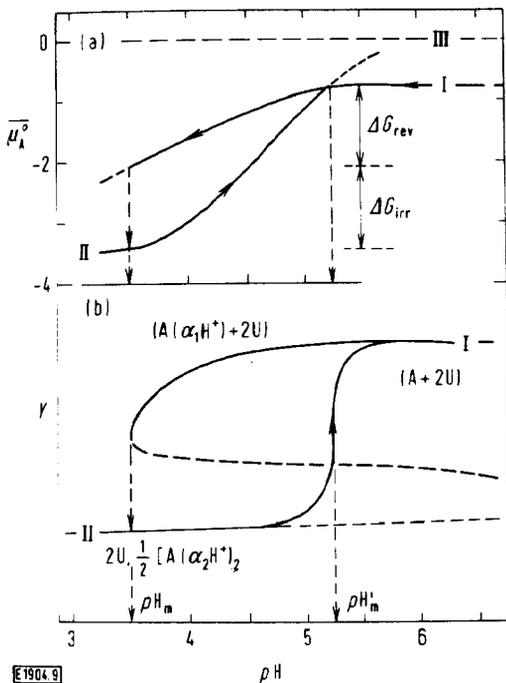


Abb. 9

a) Mittelwert des chemischen Standardpotentials $\bar{\mu}^0(A)$ eines Adenylsäure-Segments in I: Poly(A + 2U); II, [Poly A(αH^+)]₂ und III, Poly A als Referenzzustand; siehe Text
b) „Phasenumwandlungen“ im System Poly A-Poly U (1:2); bei pH_m : irreversibler Übergang I → II, bei pH'_m : Gleichgewichtsumwandlung II \rightleftharpoons I; vgl. Abb. 2

Die jeweils thermodynamisch stabilste Konformation ist diejenige, welcher der kleinste Wert von $\bar{\mu}^0(A)$ zugeordnet ist. Ausgehend von neutralem pH sollte sich der Poly(A + 2U)-Tripelstrang während der Säuretitation daher bei pH'_m in die Poly A-Doppelhelix und freies Poly U umwandeln. Diese Strukturumwandlung findet aber offensichtlich bei diesem pH-Wert nicht statt, sondern die fortschreitende Protonierung baut einen metastabilen Intermediärzustand auf: den partiell protonierten, teilweise aufgeknauelten Tripelstrang. Erst bei pH_m wird dieser Dreistrang-Komplex instabil und bricht unter spontaner Bildung von [Poly A(αH^+)]₂ zusammen. Dabei werden die restlichen (A + 2U)-Sequenzen des Tripelstranges unter Protonierung aufgelöst.

Die Bildung des zur Hysterese führenden metastabilen Intermediärzustands wird im einfachsten Fall durch die Annahme von Nucleationsbarrieren erklärt. Einerseits erschwert die kooperative Stabilisierung der Poly(A + 2U)-Tripelhelix die Protonierung des A-Segments, andererseits befinden sich die protonierten A-Reste der offenen Enden und Loops des Tripelstranges dann in unmittelbarer Nähe des elektrischen Feldes der Phosphate der Uridylsäurestränge. Die größtenteils elektrostatisch stabilisierte [A(αH^+)]₂-Basenpaarung wird jedoch bei hohen Ionenstärken labilisiert. Zudem erfordert die Bildung dieser Basenpaarung eine parallele Anordnung der Stränge, so daß am wahrscheinlichsten nur die A-Kettenglieder in den offenen Enden zweier verschiedener Tripelstränge für die bimolekulare Nucleation von [A(αH^+)]₂-Sequenzen in Frage kommen.

So scheinen elektrostatisch und sterisch ungünstige Bedingungen das System Poly(A + 2U) während der Säure-

titration zunächst zu einem „Umweg“ zu zwingen. Der teilweise aufgeknäuelte und partiell protonierte Tripelstrang bildet als Intermediärspezies den im Vergleich zur [Poly A(αH^+)]₂-Doppelhelix langlebigen metastabilen Zustand.

Erst wenn die A(αH^+)-Sequenzen des Tripelstranges durch pH-Erniedrigung länger werden und sich der mittlere Abstand zu den U-Sequenzen erhöht, vergrößert sich die Wahrscheinlichkeit für die Nucleation stabiler Starter-Sequenzen. Das erfolgt jedoch in einem pH-Bereich, in dem die Assoziation spontan in einem reißverschlußartigen Prozeß zu [Poly A(αH^+)]₂ und freiem Poly U führt.

Bei der Basetitration beginnend von niedrigen pH-Werten (längs Kurve II, Abb. 9) findet zunächst eine Deprotonierung der Poly A-Doppelhelix statt. Bei weiterer pH-Erhöhung erfolgt eine Gleichgewichtsreaktion mit den U-Segmenten von Poly U-Molekülen. Dieses Helix-Helix-Umwandlungsgleichgewicht ist in Abb. 9 durch den Umwandlungspunkt pH'_m als Schnittpunkt der Kurven I und II repräsentiert.

Die Bildung von (A + 2U)-Sequenzen ist scheinbar trimolekular [14]. Je ein deprotoniertes A-Segment muß mit je zwei U-Resten reagieren, um (A + 2U)-Sequenzen zu bilden. Die bei der Basetitration auftretenden Intermediärformen sind wahrscheinlich Riesenzustände aus mehreren Poly A- und Poly U-Strängen, die durch [A(αH^+)]₂- und (A + 2U)-Sequenzen verbunden sind [22].

Gleichgewichtsverschiebungen können über die Zwischenbereiche einsträngiger A-Sequenzen ablaufen. Falls jedoch bei einem pH-Anstieg die Nucleationslänge der [A(αH^+)]₂-Sequenzen unterschritten wird, ist eine Rückreaktion wegen der angeführten Nucleationsbarrieren praktisch nicht möglich. Damit erscheint der letzte Teil der Basetitration ebenfalls irreversibel. Jedoch ist nur ein kleiner Teil der Kettenglieder davon betroffen, ihr Beitrag zur freien Enthalpie daher vernachlässigbar klein.

Die bei der Basetitration stattfindenden Strukturumwandlungen sind als Helix-Helix-Übergänge in komplexer Reaktion (scheinbar trimolekular) extrem langsam. Damit ist die experimentell beobachtete sehr langsame Gleichgewichtseinstellung zu erklären.

2. Reaktionsausmaß (ξ) bei Hysterese

Wie die Abb. 3–6 demonstrieren, erhält man bei potentiometrischen als auch bei spektrophotometrischen Titrations des Modellsystems Hystereseschleifen. Protonierungsgrad und optische Dichte sollten daher in ihrer pH-Abhängigkeit dieselben Vorgänge beschreiben.

Im Modellsystem sind der Poly A-Doppelstrang (mit dem Protonierungsgrad α_2) und der Poly(A + 2U)-Tripelstrang (mit dem Protonierungsgrad α_1) im wesentlichen die Protonierungspartner. Der mittlere Protonierungsgrad $\alpha(A + 2U)$ der in Gleichung (4) beschriebenen Reaktion, deren Ausmaß ξ_1 ist, läßt sich daher nach Gleichung (10) formulieren

$$\alpha_{(A+2U)} = (1 - \xi_1)\alpha_1 + \xi_1\alpha_2 \quad (10)$$

Wird α_1 nach Gleichung (6) mit $pK'_1 = 3.52$ berechnet, läßt sich ξ_1 mit Hilfe potentiometrischer Daten, Abb. 3, als Funktion des pH-Werts bestimmen. Das Ergebnis dieser Berechnungen ist in Abb. 10 dargestellt.

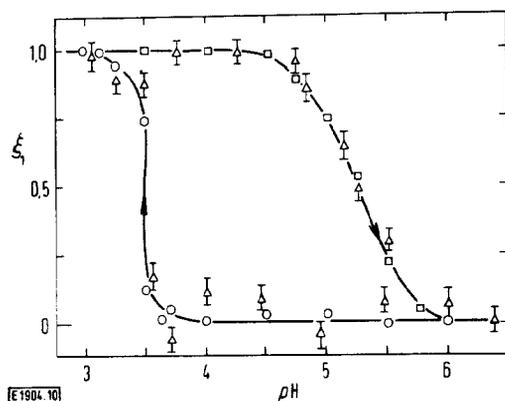


Abb. 10
Reaktionsausmaß ξ_1 der Strukturumwandlung
 $2(A + 2U) \xrightarrow{-\text{H}^+} [A(\alpha\text{H}^+)]_2 + 4U$
als Funktion des pH-Werts. Säure-Base-Titration: (○, □) berechnet
nach Gleichung (10), (△) nach Gleichung (12)

Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, daß während der Säuretitration von pH 7 bis etwa pH 3,5 ξ_1 praktisch gleich Null bleibt. Bei pH 3,5 ändert sich ξ_1 dann sprunghaft und hat für $\text{pH} \leq 3,2$ den Wert 1. Dieses Verhalten von ξ_1 reflektiert die spontane Bildung von $[Poly A(\alpha\text{H}^+)]_2$ bei pH 3,5. Bei der Basetitration zeigt ξ_1 ein ganz anderes Verhalten. Von niedrigen pH-Werten bis etwa pH 4,5 bleibt ξ_1 konstant 1 und ändert sich dann zwischen pH 4,5 und pH 6 allmählich von 1 auf 0. Dieser „sanften“ Änderung von ξ_1 ist die Rückbildung von Poly(A + 2U) als Gleichgewichtsreaktion zugeordnet (siehe VI., 1.).

Die optische Dichte des Systems ist als Summe der Anteile aller Reaktionspartner, auf 1 Mol Ketteneinheit bezogen, durch Gleichung (11) ausdrückbar.

$$\varepsilon = (1 - \xi_1)(1 - \alpha_1)\varepsilon_1 + (1 - \xi_1)\alpha_1\varepsilon_6 + \xi_1\varepsilon_3 + 2\xi_1\varepsilon_4. \quad (11)$$

In Gleichung (11) ist der Extinktionskoeffizient ε_6 der aufgeknauelten, protonierten $(A\alpha_1\text{H}^+ + 2U)$ -Untereinheit des Tripelstranges in erster Näherung gleich $\varepsilon_6 = \varepsilon_5 + 2\varepsilon_4$; siehe Gleichung (7).

Nach Einsetzen der Zahlenwerte – siehe Abschnitt IV., 1. – folgt für ξ_1 die Gleichung (12):

$$\xi_1 = \frac{17,35 [\text{rel. O.D.}] - 11,1 \alpha_1}{8,68 - 11,1 \alpha_1}. \quad (12)$$

Die relative optische Dichte (rel. O.D.) ist als das Verhältnis der bei einem bestimmten pH-Wert gemessenen optischen Dichte zu derjenigen bei pH 7 definiert (siehe Abb. 4 und 6).

Die nach Gleichung (12) mit Hilfe optischer Daten berechneten Werte für ξ_1 zeigen in guter Übereinstimmung mit den nach Gleichung (10) berechneten ξ_1 -Werten dieselbe pH-Abhängigkeit. So sind potentiometrische und optische Daten mit der theoretischen Analyse konsistent.

Die pH-Abhängigkeit des Protonierungsgrads $\alpha_{(A+U)}$ einer Poly(A + U)-Lösung ist in Gleichung (13) wiedergegeben.

$$\alpha_{(A+U)} = \frac{1}{2}(1 + \xi_1)\xi_2\alpha_2 + \frac{1}{2}(1 - \xi_1)\xi_2\alpha_1. \quad (13)$$

In Gleichung (13) bedeutet ξ_2 das Ausmaß der in Gleichung (5) beschriebenen Reaktion.

Mit Hilfe der potentiometrischen und optischen Daten der Abb. 5 und 6 ergeben sich Bestimmungsgleichungen für ξ_2 und ξ_1 .

$$\xi_2 = \frac{13,64(\alpha_2 - \alpha_1)(\text{rel. O.D.}) - \alpha_{(A+U)}(8,68 - 11,1 \alpha_1)}{\alpha_2(11,1 \alpha_1 - 5,68) - 2,73 \alpha_1} \quad (14)$$

$$\xi_1 = \left[\frac{2\alpha_{(A+U)}}{\xi_2} - (\alpha_2 + \alpha_1) \right] (\alpha_2 - \alpha_1)^{-1}. \quad (15)$$

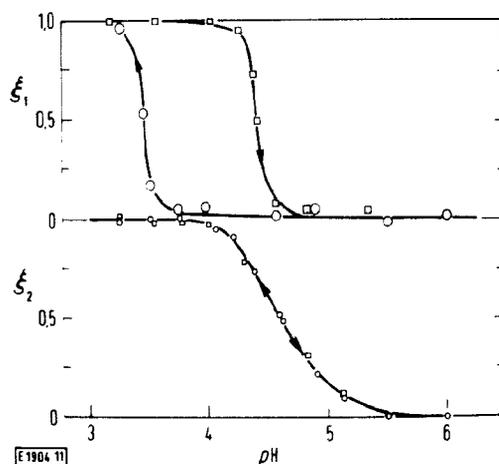


Abb. 11
Poly(A + U): pH-Abhängigkeit von ξ_2 , Gleichung (5) und ξ_1 , Gleichung (4), berechnet nach Gleichung (14) und Gleichung (15). (○) Säure- und (□) Basestitration

Die Ergebnisse für die pH-Abhängigkeit von ξ_1 und ξ_2 sind in Abb. 11 gezeigt. Bei der Säuretitration ist ξ_1 in diesem System praktisch identisch mit den ξ_1 -Werten des Systems Poly(A + 2U), Abb. 10. Das deutet an, daß es sich um dieselbe Reaktion, Gleichung (4), handelt. Wegen der angekoppelten Bildung von (A + U)-Sequenzen ist im System Poly(A + U) bei der Basetitration ξ_1 bei gleichem pH-Wert kleiner als der entsprechende ξ_1 -Wert für Poly(A + 2U).

Im System Poly(A + U) beweist die Gleichheit der pH-Abhängigkeit von ξ_2 bei der Säure- und Base-Titration die Reversibilität der in Gleichung (5) beschriebenen Reaktion. Da diese Reaktion in ihren Elementarschritten das Auftreten von (aus den Basenpaaren) entkoppelten U-Segmenten erfordert, ist es einsichtig, daß die Wechselwirkung zwischen $[A(\alpha\text{H}^+)]_2$ -Assoziaten mit U-Monomersegmenten in einer Gleichgewichtsreaktion zu (A + 2U)- bzw. (A + U)-Sequenzen führen sollte.

Neben der Erkenntnis, daß Hysterese in dem A-U-Modell nur in Poly(A + 2U) auftritt, führt die Analyse der pH-Abhängigkeit der ξ -Werte zu der Schlußfolgerung, daß die Hysterese in diesem System nur *halbseitig* ist. Wie im unteren Teil der Abb. 9 schematisch angedeutet, erfolgt der Strukturübergang I → II bei pH_m spontan, während der umgekehrte Prozeß II → I eine Gleichgewichtsumwandlung ist (vgl. Abb. 2).

Die in Abb. 9 gegebene Darstellung beschreibt angenähert das Verhalten einer Einzeldomäne hochmolekularer Polynucleotide gleicher Kettenlänge.

3. Entropieproduktion

In Systemen, die Hysterese aufweisen, öffnen potentiometrische Titrations die Möglichkeit, die bei einem Umlauf der Hystereseschleife irreversibel dissipierende freie Enthalpie, ΔG , und die damit verbundene „Entropieproduktion“ ΔS_{irr} zu bestimmen.

$$\Delta S_{\text{irr}} = -\frac{1}{T} \Delta G \geq 0. \quad (16)$$

Wir definieren das Produkt $-T\Delta S_{\text{irr}}$ als den Verlust ΔG_{irr} der freien Enthalpie bei einem isotherm-isobaren Hystereseumlauf.

$$\Delta G_{\text{irr}} = -T\Delta S_{\text{irr}}. \quad (17)$$

Die während der Titration auftretenden Änderungen der chemischen Potentiale der Polymeren, bzw. der Kettenglieder können mit Hilfe einer allgemeinen Maxwell-Beziehung bestimmt werden [32].

Für die Reaktion des Adenylsäurerestes A, dessen chemisches Potential $\mu(A)$ ist, mit HCl gilt:

$$\left(\frac{\partial \mu(A)}{\partial n_{\text{HCl}}}\right)_{n \neq n_{\text{HCl}}} = -\left(\frac{\partial n_{\text{HCl}}}{\partial n_A}\right)_{\mu_{\text{HCl}}, n \neq n_{\text{HCl}}, n_A} \quad (18)$$

wobei n_i die Molzahl der Komponente i ist, und die Notierung $n \neq n_i$ bedeutet konstante Molzahlen, außer n_i .

Während der Titrations ändert sich die NaCl-Konzentration (0,1 M) nicht und das chemische Potential der Chlorid-Ionen wird als konstant angenommen. Unter Anwendung der Guggenheim-Approximation $d\mu_{\text{HCl}} = d\mu_{\text{H}^+}$ folgt daher: $d\mu_{\text{HCl}} = -2,3 RT d\text{pH}$. Um der Forderung konstanten pH-Wertes – rechte Seite von Gleichung (18) – zu genügen, muß $dn_{\text{HCl}} = -\alpha dn_A$ gelten. (α ist der jeweilige mittlere Protonierungsgrad.)

Die integrierte Form von Gleichung (19)

$$\left(\frac{\partial \mu(A)}{\partial \text{pH}}\right)_{n \neq n_{\text{HCl}}} = -2,3 RT \cdot \alpha \quad (19)$$

beschreibt die pH-Abhängigkeit des Protonierungsgrads.

Die Änderung der freien Enthalpie des hysteretischen Systems kann formal in einen reversiblen und einen irreversiblen Anteil aufgeteilt werden, $dG = dG_{\text{rev}} + dG_{\text{irr}}$. Für einen geschlossenen Säure-Base-Titrationszyklus gilt allgemein $\oint dG = 0$.

Die Entropieproduktion während der Säure-Base-Titration im System Poly A-Poly U (1:2) sollte nach der Interpretation der Titrationskurven und des Phasendiagramms auf der spontanen Bildung von $[\text{Poly A}(\alpha\text{H}^+)]_2$ beruhen und daher unmittelbar aus der Protonierungsreaktion des Adenylsäurerestes resultieren. Damit gilt:

$$dG_{\text{irr}} = \left(\frac{\partial \Delta \mu(A)}{\partial \text{pH}}\right) d\text{pH}.$$

Analog Gleichung (19) ergibt die Integration über den pH-Bereich der Hysterese den auf 1 mol Adenylsäure-Segment bezogenen Wert:

$$\Delta G_{\text{irr}} = -2,3 RT \int \Delta \alpha d\text{pH}. \quad (20)$$

Das Integral $\int \Delta \alpha d\text{pH}$ ist geometrisch die Fläche der potentiometrischen Hystereseschleife.

Experimentell ergibt sich $\Delta G_{\text{irr}} (20^\circ\text{C}) = -1,43 (\pm 0,1)$ kcal/mol (A).

Nach Gleichung (17) ist die Entropieproduktion $\Delta S_{\text{irr}} = 2,3 R \int \Delta \alpha d\text{pH}$. Mit dem Zahlenwert für ΔG_{irr} erhält man $\Delta S_{\text{irr}} (20^\circ\text{C}) = 4,9 (\pm 0,1)$ cal (M (A) grad) $^{-1}$.

4. Zuordnung von ΔG_{irr}

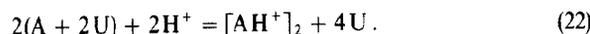
Der Gesamtwert des bei einem isotherm-isobaren Hystereseumlauf auftretenden Verlusts an freier Enthalpie, $\Delta G_{\text{irr}}(A)$, auf ein Mol Adenylsäure-Segment bezogen, läßt sich auf die Standardwerte der freien Reaktionsenthalpien ΔG_i^0 aller spontan erfolgenden Reaktionen i zurückführen. Ist μ_j^0 der Standardwert des chemischen Potentials der j -ten Komponente, v_j der stöchiometrische Koeffizient und a_j die Aktivität der j -ten Komponente in der i -ten Reaktion (Reaktionsausmaß ξ_i), erhält man für konstanten Druck und Temperatur die allgemeine Beziehung:

$$\Delta G_i = \left(\sum_j v_j \mu_j^0 + RT \sum_j v_j \ln a_j\right) \xi_i.$$

Auf der Konzentrationsunabhängigkeit gemessener (scheinbarer) Zustandsgrößen hochmolekularer Polynucleotidsysteme [31] basiert die Annahme konstanter Aktivitätskoeffizienten der Kettenglieder. Für einen stöchiometrischen (molaren) Umsatz, d. h. $c_j = 1$ mol/liter ergibt sich die Gleichung (21):

$$\Delta G_{\text{irr}}(A) = \sum_i \left(\sum_j v_j \mu_j^0\right) \xi_i = \sum_i \Delta G_i^0 \xi_i. \quad (21)$$

Die der Hystereseschleife im System Poly A-Poly U (1:2) zugrunde liegende Umsatzgleichung lautet bezüglich der operativen Ketten-Untereinheiten analog Gleichung (4):



Die Änderung der freien Enthalpie ΔG^0 für einen stöchiometrischen Umsatz nach Gleichung (22) ist pH-abhängig. Da definitionsgemäß $\mu^0(H^+) = 0$, ergibt sich:

$$\Delta G^0(\text{pH}) = \mu^0[AH^+]_2 + 4\mu^0(U) - 2\mu^0(A + 2U). \quad (23)$$

Die phänomenologische Interpretation des Säure-Base-Verhaltens des Modellsystems beschreibt die bei der Säuretitration ablaufenden Reaktionen in Stufen: das reversible gekoppelte Helix-Knäuel-Protonierungsgleichgewicht gefolgt von der irreversiblen Assoziation von protonierten A-Segmenten des Tripelstranges zur Poly A-Doppelhelix unter Auflösung und Protonierung der restlichen (A + 2U)-Sequenzen. Für die dabei auftretende Gesamtänderung der freien Reaktionsenthalpie läßt sich daher formal die Beziehung (24) schreiben. Siehe auch Abb. 9(a).

$$\Delta G^0 = \Delta G_{\text{rev}} + \Delta G_{\text{irr}}. \quad (24)$$

Der reversible Anteil ΔG_{rev} ist der Reaktion nach Gleichung (7) zugeordnet, deren Ausmaß bei $\text{pH} = 3,5$ durch den Protonierungsgrad $\alpha_1 = 0,55$ gegeben ist. (Vgl. Abb. 3, $\alpha(A + 2U) = \alpha_1$ für $0 \leq \alpha_1 \leq 0,55$.)

Da die Reaktion nach Gleichung (7) über die in den Gleichungen (8) und (9) beschriebenen Elementarreaktionen verläuft, gilt für ΔG_{rev} :

$$\Delta G_{\text{rev}} = \alpha_1 (\Delta G^0(A + 2U) + \Delta G_{p,1}^0). \quad (25)$$

In Gleichung (25) bedeutet $\Delta G^0(A + 2U)$ die freie Reaktionsenthalpie der Helix-Knäuel-Umwandlung nach Gleichung (8). $\Delta G_{p,1}^0$ ist als Standardwert der freien Protonierungsenthalpie der Gleichung (9) zugeordnet.

Der irreversible Anteil ΔG_{irr} , Gleichung (24), ergibt sich als Differenz von ΔG^0 und ΔG_{rev} . Die Größe von ΔG^0 ist mit Hilfe der Ergebnisse der Basetitration berechenbar. Die bei der Helix-Helix-Umwandlung während der Basetitration an die Protonierungsreaktionen gekoppelten Strukturänderungen lassen sich über einfache Helix-Knäuel-Umwandlungen analysieren.

Unter Vernachlässigung des kleinen Anteils der A-Segmente, die sich rein sterisch nicht in $(A + 2U)$ - oder $[A(\alpha H^+)]_2$ -Sequenzen befinden können [22], erhält man die der Reaktion nach Gleichung (22) zugeordnete Umwandlungsenthalpie formal als Summe der freien Reaktionsenthalpien der Helix-Knäuel-Umwandlungen nach Gleichung (8) und Gleichung (1):

$$\Delta G^0(pH) = 2\Delta G^0(A + 2U) + \Delta G^0[A(\alpha_2 H^+)]_2. \quad (26)$$

Nach der Definition des pH_m -Werts als pH-Wert bei $\xi_1 = 0,5$ (Gleichung (22)) gilt für ΔG^0 als die relative, den Konformationsanteil der freien Enthalpie erfassende Größe, $\Delta G^0(pH_m) = 0$ [31]. Daher ergibt sich bei $pH_m = 5,25$ für die freie Bildungsenthalpie $\Delta G^0[A(\alpha_2 H^+)]_2$ der partiell protonierten doppelhelicalen A-Sequenzen die Gleichung (27).

$$\Delta G^0[A(\alpha_2 H^+)]_2 = -2\Delta G^0(A + 2U). \quad (27)$$

Bei pH-Erniedrigung wird die partiell protonierte Poly A-Doppelhelix durch den Anteil der freien Protonierungsenthalpie $\Delta G_{p,2}^0$ der $[AH^+]_2$ -Sequenzen stabilisiert. Daher läßt sich die freie Bildungsenthalpie $\Delta G^0[AH^+]_2$ der vollständig protonierten Poly A-Doppelhelix nach der Beziehung (28) formulieren.

$$\Delta G^0[AH^+]_2 = \Delta G^0[A(\alpha_2 H^+)]_2 + 2(1 - \alpha_2)\Delta G_{p,2}^0. \quad (28)$$

Aus Abb. 3 folgt mit Gleichung (10) für $\alpha_2(pH_m) = 0,53$.

Für den irreversiblen Anteil $\Delta G_{irr}(A)$, bezogen auf ein Mol A-Segment, resultiert nach der Zusammenfassung der Gleichungen (24) bis (28) die Gleichung (29).

$$\Delta G_{irr}(A) = (1 - \alpha_2)\Delta G_{p,2}^0 - \alpha_1(\Delta G^0(A + 2U) + \Delta G_{p,1}^0). \quad (29)$$

Die freie Umwandlungsenthalpie $\Delta G^0(A + 2U)$ für den Strukturübergang der Tripelhelix in die getrennten Einzelstränge kann nach einer von Massoulié [14] angegebenen Gleichung mit Hilfe kalorimetrischer Meßwerte [31] berechnet werden [33]. In dieser Gleichung werden sowohl Temperatur- und Ionenstärkeabhängigkeit $RTC(1 - 2\lg c_{NaCl})$ als auch der Anteil $2,3RT[1 + \exp(\Delta G_A^0/RT)]$ des temperaturabhängigen Stapelgleichgewichts von einzelsträngigem Poly A berücksichtigt. Für 0,1 M (NaCl) folgt:

$$\Delta G^0(A + 2U) = \Delta G_0^0(A + 2U) - 1,5RTC - 2,3RT[1 + \exp(\Delta G_A^0/RT)]. \quad (30)$$

$\Delta G_0^0(A + 2U)$ ist die freie Umwandlungsenthalpie von Poly(A + 2U) in die vollständig statistisch geknäuelten Einzelstränge. Die Kötin-Konstante [34] C ist nach Massoulié für das System Poly(A + 2U), $C = 1,27$.

Bei 20°C ist die freie Stacking-Enthalpie des Poly A, $\Delta G_A^0 = 0,6(\pm 0,1)$ kcal/M(A), [33, 35], und mit $\Delta G_0^0(A + 2U) = 2,7(\pm 0,2)$ kcal/M(A + 2U), [31], resultiert $\Delta G^0(A + 2U) = 0,8(\pm 0,2)$ kcal/M(A + 2U).

Die Bestimmung der freien Protonierungsenthalpie erfolgt nach Gleichung (31).

$$\Delta G_p^0 = -2,3RTpK. \quad (31)$$

Die potentiometrische Titrationskurve der Polynucleotide als Polyelektrolyte ist durch die Gleichung (32) beschreibbar [36].

$$pH = pK + \lg \frac{1 - \alpha}{\alpha} - e\psi(2,3kT)^{-1}. \quad (32)$$

In Gleichung (32) bedeuten: K , die Dissoziationskonstante eines (AH^+) -Segments; α , der Protonierungsgrad; e , die Ladung des Protons; ψ , das Potential des geladenen Polynucleotidians und k , die Boltzmann-Konstante.

Der elektrostatische Anteil $\Delta pK = e\psi(2,3kT)^{-1}$ für die Protonierung des Adeninrests im Tripelstrang Poly(A + 2U) ist unabhängig von α ; für die $[Poly A(\alpha H^+)]_2$ -Doppelhelix ist ΔpK jedoch abhängig von α [37, 16].

Durch Definition ist $pH_{(\alpha=0,5)} = pK'$, und es gilt allgemein die Beziehung (33).

$$pK = pK' - \Delta pK. \quad (33)$$

Werden die Berechnungen der elektrostatischen Anteile unter Berücksichtigung der effektiven Ladung der Polyelektrolyte [37] analog der von Holcomb und Timasheff [16] benutzten Methode durchgeführt [22], erhält man für Poly(A + 2U) $\Delta pK_1 = 0,12$ und $\Delta pK_2 = 0,22$ für $[Poly A(\alpha H^+)]_2$.

Mit $pK'_1 = 3,52$ und $pK'_2 = 5,62$, Abb. 3, berechnet man nach Gleichung (31) und (33)

$$\Delta G_{p,1}^0 = -4,6 \text{ kcal/M(A)}$$

und

$$\Delta G_{p,2}^0 = -7,3 \text{ kcal/M(A)}.$$

Nach Einsetzen der Zahlenwerte in Gleichung (29) erhält man für 20°C,

$$\Delta G_{irr}(A) = -1,35(\pm 0,1) \text{ kcal/M(A)}.$$

Der Vergleich dieses berechneten Werts mit dem Meßwert $\Delta G_{irr}(A) = -1,43(\pm 0,1)$ kcal/M(A) ergibt innerhalb der Fehlergrenzen eine gute Übereinstimmung. Damit ist quantitativ gezeigt, daß sich der irreversible Prozeß während des isothermen Säure-Base-Titrationszyklus auf den spontanen Zusammenbruch des metastabilen, teilweise aufgeknäuelten, partiell protonierten Tripelstrangs Poly(A + 2U) und die Bildung von $[Poly(AH^+)]_2$ bei der Säuretitation zurückführen läßt.

VII. Relation zu natürlicher RNA

Da im Poly A-Poly U-Modellsystem Hysterese nur bei Poly(A + 2U) auftritt, ist es wahrscheinlich, daß auch in natürlicher RNA die das hysteretische Verhalten bedingenden Strukturformen an Adenin und Uracil reiche Sequenzen in den Konformationen des A-Doppelstrangs oder in helicalen A-U-Komplexen sind. Diese Kombination der Sekundär-

struktur scheint zu genügend hohen Energiebarrieren fähig, so daß sich beträchtliche, langlebige Metastabilitäten entwickeln können. (Jedoch sind wegen der komplizierteren Struktur der RNA auch andere Konformationskombinationen denkbar.) Da Energiebarrieren ein System versteifen, bedeutet das Auftreten von nur einseitiger Hysterese eine „Konzession“ an die Dynamik, die Flexibilität des Systems.

Es ist nun möglich, daß in Lebewesen Nervenimpulse in Teilbereichen von RNA-Kettenmolekülen, die sich in unmittelbarer Nähe der Nervenmembran befinden [3], konformative Strukturänderungen bewirken (vgl. Gleichung (32)).

Um im Poly A-Poly U-Modellsystem ein Mol A aus dem metastabilen Zustand in die doppelstrangige Alternativstruktur zu transferieren, ist bei 20°C ein Betrag von $\Delta G_{irr}(A) = -1,5 \text{ kcal/M}(A)$ oder 0,065 eV pro Mol nötig. Das entspricht einer Potentialdifferenz von 65 mV. An der Nervenmembran entstehen pro Nervenimpuls Potentialdifferenzen zwischen 70 und 80 mV. Damit ist energetisch ein solcher Vorgang möglich.

Während die covalente Primärstruktur der Basensequenzen in Desoxyribonucleinsäure zur stabilen Speicherung genetischer Information dient, Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen aus Gründen dynamischer Flexibilität nur durch schwache Wechselwirkungen (kooperativ) stabilisiert sind, bieten die Konformationstypen von RNA eine Möglichkeit, in der Sekundärstruktur Änderungen der Umweltbedingungen aufzuzeichnen und vorübergehend zu speichern.

E. N. dankt der Stiftung Volkswagenwerk für die Finanzierung des Forschungsaufenthalts am Weizmann-Institut, D. H. Everett, H. Träuble und A. Oplatka für anregende Diskussionen, H. Eisenberg für die Möglichkeit, die spektrophotometrischen Messungen in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, A. Shatka y für wertvolle Hinweise und M. Mevarech für einige Hilfe bei den potentiometrischen Titrationen.

Literatur

- [1] R. B. Roberts und L. B. Flexner, *Quart. Rev. Biophysics* 2, 135 (1969).
- [2] Vgl. z. B.: H. v. Förster, „Das Gedächtnis“, Denticke, Wien 1948; H. v. Förster, *Transact. 6th Conf. Cybernetics*, New York 1949; P. Fong, *Biophysic. J. Soc. Abstr.* 9, A 209 (1969); V. Yu Urbakh, *J. theoret. Biol.* 20, 358 (1968); J. V. McConnell, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 52, 1 (1959).
- [3] H. Hydén und P. W. Lange, *Science* 159, 1370 (1968); H. Hydén, in „The Neurosciences“, G. C. Quarton, Ed., Rockefeller University Press, N.Y. 1967, S. 248, 765.
- [4] R. A. Cox, A. S. Jones, G. E. Marsh und A. R. Peacocke, *Biochim. Biophysica Acta* 21, 576 (1956); R. A. Cox und U. Z. Littauer, *Biochim. Biophysica Acta* 72, 188 (1963).
- [5] R. A. Cox, *Biochim. Biophysica Acta* 68, 401 (1963).
- [6] R. A. Cox, *Quart. Rev.* 22, 499 (1968).
- [7] A. Katchalsky, A. Oplatka und A. Litan, *Symp. Soc. Gen. Physiol.* (1964), „Molecular Architecture in Cell Physiology“, Ed. T. Hayashi und A. G. Szent-Györgyi, Prentice-Hall, N.Y. 1966, S. 3; A. Katchalsky und A. Oplatka, *Israel J. med. Sci.* 2, 4 (1966); A. Katchalsky, in „Biology and the Physical Sciences“, Ed. S. Devons, Columbia University Press, N. Y. 1969, S. 267.
- [8] A. Katchalsky und R. Spangler, *Quart. Rev. Biophysics* 1, 127 (1968).
- [9] D. H. Everett und W. I. Whitton, *Trans. Faraday Soc.* 48, 749 (1952).
- [10] D. H. Everett, in „The Solid-Gas Interface“, Ed. E. A. Flood, Bd. 2, M. Dekker, N. Y. 1967, S. 1055; enthält umfassendes Lit.-Verz.
- [11] A. Compagner, *J. physic. Soc. Japan* 26 (Suppl.), 229 (1969).
- [12] R. F. Steiner und R. F. Beers, jr., „Polynucleotides“, Elsevier Publ. Co., Amsterdam 1961; G. Felsenfeld und T. H. Miles, *Ann. Rev. Biochem.* 36, 407 (1967); A. M. Michelson, J. Massoulié und W. Guschlbauer, *Progr. Nucl. Acid Res.* 6, 83 (1967).
- [13] *CRC-Handbook, Biochem. Mol. Biol.*, Ed. H. A. Sober, CRC Ohio 1968; J. J. Christensen und R. M. Izatt, *J. physic. Chem.* 66, 1030 (1962).
- [14] J. Massoulié, *European J. Biochem.* 3, 439 (1968).
- [15] A. Rich, D. R. Davies, F. H. C. Crick und J. D. Watson, *J. mol. Biol.* 3, 71 (1961); W. Cochran, *Acta Crystallogr.* 4, 81 (1951).
- [16] D. N. Holcomb und S. N. Timasheff, *Biopolymers* 6, 513 (1968); enthält umfassendes Lit.-Verz.
- [17] R. C. Warner, *Federation Proc.* 15, 379 (1956).
- [18] A. Rich und D. R. Davies, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 3548 (1956); G. Felsenfeld, D. R. Davies und A. Rich, *J. Amer. chem. Soc.* 79, 2023 (1957).
- [19] D. W. Hennage, D. M. Crothers und D. B. Ludlum, *Biochemistry* 8, 2298 (1969).
- [20] C. L. Stevens und G. Felsenfeld, *Biopolymers* 2, 293 (1964).
- [21] R. D. Blake und J. R. Fresco, *J. mol. Biol.* 19, 145 (1966); R. D. Blake, J. Massoulié und J. R. Fresco, *J. mol. Biol.* 30, 291 (1967); R. D. Blake, L. C. Klotz und J. R. Fresco, *J. Amer. chem. Soc.* 90, 3556 (1968).
- [22] E. Neumann und A. Katchalsky, in Vorbereitung.
- [23] H. Eisenberg und G. Felsenfeld, *J. mol. Biol.* 30, 17 (1967).
- [24] L. D. Inners und G. Felsenfeld, *J. mol. Biol.* 50, 373 (1970).
- [25] C. Tanford, „Physical Chemistry of Macromolecules“, Wiley, N.Y. (1965).
- [26] H. S. Harned und B. B. Owen, „Physical Chemistry of Electrolytic Solutions“, Reinhold P. C., N. Y. (1965).
- [27] J. T. Finch und A. Klug, *J. mol. Biol.* 46, 597 (1969).
- [28] J. Clauwaert, *Z. Naturforsch.* 23b, 454 (1968).
- [29] R. F. Steiner und R. F. Beers, *Biochim. Biophysica Acta* 33, 470 (1959).
- [30] T. L. Hill, *J. chem. Physics* 30, 383 (1959); B. H. Zimm, *J. chem. Physics* 33, 1349 (1960); S. Lifson und B. H. Zimm, *Biopolymers* 1, 15 (1963).
- [31] E. Neumann und T. Ackermann, *J. physic. Chem.* 73, 2170 (1969); E. Neumann, Dissertation, Münster (1967).
- [32] A. Litan, *J. physic. Chem.* 70, 3107 (1966).
- [33] D. Pörschke, Dissertation, Göttingen (1968).
- [34] L. Kotin, *J. mol. Biol.* 7, 309 (1963).
- [35] J. Prahms, A. M. Michelson und K. E. Van Holde, *J. mol. Biol.* 15, 467 (1966).
- [36] A. Katchalsky, Z. Alexandrowicz und O. Kedem, in „Chemical Physics of Ionic Solutions“, Ed. B. E. Conway und R. G. Barradas, John Wiley N.Y. (1966), S. 295.
- [37] A. R. Peacocke und S. Lifson, *Biochim. Biophysica Acta* 22, 191 (1956).