

Kalorimetrische Untersuchungen an Biopolymeren und Aggregaten von Phospholipiden

Von Theodor Ackermann*

Professor Christoph Rüchardt zum 60. Geburtstag gewidmet

Die in wäßriger Lösung ablaufenden Strukturumwandlungen von Biopolymeren sind komplexe Vorgänge, deren Mechanismus nur durch die Kopplung verschiedener Teilprozesse erklärt werden kann. Eine spektroskopische Analyse der Systemzustände ist oft mit beträchtlichem Aufwand verbunden. Für eine orientierende Charakterisierung des Systemverhaltens erweist sich in vielen Fällen eine kalorimetrische Untersuchung als ausreichend. Diese Messung liefert wichtige Aussagen über die Stabilität der Ausgangszustände und über die Kooperativität des Gesamtvorganges. Aus den thermodynamischen Parametern des untersuchten Systems ergeben sich Hinweise auf den strukturbestimmenden Einfluß der verschiedenen Typen inter- und intramolekularer Wechselwirkungen. Dies gilt nicht nur für Lösungen von Biopolymeren und analogen Modellsubstanzen, sondern auch für Lösungen von Komplexen aus Biopolymeren und niedermolekularen Liganden sowie für wäßrige Suspensionen selbstaggregierender Phospholipide. Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung kalorimetrischer Meßverfahren werden an typischen Beispielen aus der Vielzahl der untersuchten Polypeptid- und Polynucleotidsysteme und der Phospholipid-Doppelschichtsysteme erläutert. Es wird auch auf die bei Messungen an verdünnten Lösungen zu beachtenden methodischen Besonderheiten hingewiesen, wobei die in neuerer Zeit erzielten meßtechnischen Fortschritte deutlich erkennbar werden.

1. Einleitung

Die Strukturen der Proteine und Nucleinsäuren sind hoch geordnet. Dabei beschränkt sich die molekulare Ordnung nicht auf die kovalente Verknüpfung der atomaren Bausteine (Primärstruktur). Die durch Wasserstoffbrückenbindungen fixierten Helixsequenzen der Sekundärstruktur sind ein charakteristisches Merkmal dieser Biopolymere. Der funktionellen Mannigfaltigkeit dieser Substanzen entspricht die Vielfalt der dreidimensionalen Faltungsmuster (Tertiärstruktur). Im Verbund mit anderen intermolekularen Wechselwirkungen stabilisiert die hydrophobe Wechselwirkung den Zusammenschluß von Einzelmolekülen mit definierter Tertiärstruktur zu Molekülaggregaten (Quartärstruktur). Diese Molekülaggregate sind die Bauelemente biologischer Funktionseinheiten, die oft in das Matrixsystem der Lipiddoppelschichten von Biomembranen eingebettet sind.

Die Phospholipide sind das wichtigste Strukturelement biologischer Membranen. Ihre Fettsäureketten liegen im hydrophoben Bereich der Lipidmatrix in einer mehr oder weniger dicht gepackten Anordnung vor. In den Kohlenwasserstoffketten der Phospholipidmoleküle ist die Drehbarkeit um die Bindungsachsen zwischen benachbarten CH_2 -Gruppen eingeschränkt. Dem idealen Ordnungszustand entspricht die all-*trans*-Konformation dieser Ketten. Dieser Idealzustand ist allerdings in Biomembranen nur selten realisiert. In der Regel befinden sich die CH_2 -Gruppen der Lipidmoleküle in einem Zustand, der durch das Auftreten mehrerer *gauche-trans-gauche*-Kinken charakterisiert ist. Für die molekulare Dynamik des Lipidsystems bedeutet dies, daß

die Beweglichkeit der Molekülketten in Biomembranen wesentlich höher als in der idealen quasikristallinen Lipiddoppelschicht ist. Bei einer exakten Beschreibung des Ordnungszustandes der Phospholipide muß auch die relative Orientierung der benachbarten polaren Kopfgruppen in Betracht gezogen werden.

Ein optimaler biologischer Funktionszustand der Proteine und Nucleinsäuren und der Biopolymer-Lipid-Aggregate läßt sich nur in einem eng begrenzten Temperaturintervall bei weitgehend festgelegter Zusammensetzung des umgebenden wäßrigen Mediums aufrechterhalten. Jede Temperaturänderung führt ebenso wie eine pH-Verschiebung oder eine andere Veränderung der Lösungsmittelzusammensetzung zu einer Konformationsumwandlung der Biopolymere, die eine Funktionsminderung (Denaturierung) zur Folge hat. Einfache Modellfälle für derartige Denaturierungsprozesse sind die Helix-Knäuel-Umwandlung von Homopolypeptiden und die Doppelhelix-Denaturierung von Polynucleotiden. In Abbildung 1 ist der Übergang einer Polypeptidkette aus dem geordneten Helix- in den ungeordneten Knäuelzustand schematisch dargestellt. Im Verlauf dieser Konformationsumwandlung kann sich in einem Ensemble gleichartiger, gelöster Makromoleküle eine große Zahl unterschiedlicher molekularer Zwischenzustände einstellen, und die Realisierbarkeit dieser Zwischenzustände muß in jeder statistisch-thermodynamischen Theorie der Helix-Knäuel-Umwandlung^[1-3] in Rechnung gestellt werden. Bevorzugt sind Molekülzustände, die durch eine relativ geringe Zahl von Knäuelbereichen zwischen Helixsequenzen ausgezeichnet sind. Bei der Helix-Knäuel-Umwandlung finden vorwiegend konzertierte Übergänge zusammenhängender Helixbereiche in den Knäuelzustand statt. Der Gesamtvorgang ist ein kooperativer Prozeß, der gewisse Ähnlichkeiten mit einer Phasenumwandlung aufweist. Deshalb wird die thermisch indu-

[*] Prof. Dr. T. Ackermann
Institut für Physikalische Chemie der Universität
Albertstraße 23a, D-7800 Freiburg

zierte Helixdenaturierung häufig mit einem Schmelzvorgang verglichen, obwohl es sich nicht um eine Phasenumwandlung erster Ordnung handelt.

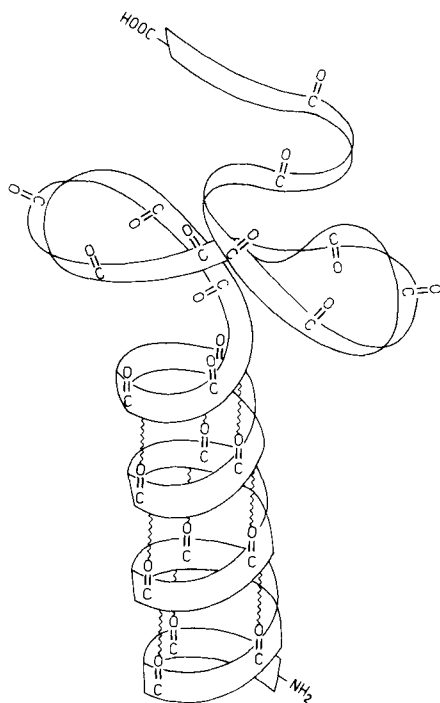


Abb. 1. Helix-Knäuel-Umwandlung einer Polypeptidkette (schematisch).

Der Übergang aus dem geordneten Helixzustand in den Zustand des ungeordneten Fadenknäuels macht sich bei der Untersuchung von Lösungen in einer Veränderung zahlreicher physikalischer Eigenschaften bemerkbar. Durch die Helix-Knäuel-Umwandlung von Polypeptiden wird z. B. das optische Drehvermögen der Polypeptidlösung in einem quantitativ bestimmbar Ausmaß beeinflusst. Auf diesem Effekt beruht ein einfaches Verfahren zur Registrierung von Umwandlungskurven, in denen der Helixumwandlungsgrad als Funktion der Temperatur dargestellt ist^[4]. In ähnlich einfacher Weise lassen sich bei Polynucleotidlösungen Helixdenaturierungskurven registrieren, da die mit der Denaturierung fortschreitende Basen-„Entstapelung“ eine Verminderung des hypochromen Effektes, d. h. eine Zunahme der UV-Extinktion zur Folge hat^[5].

Aus den Denaturierungskurven lassen sich Aussagen über die Stabilität von Sekundärstrukturen mit unterschiedlichen Segmenteinheiten ableiten. Eine genauere Analyse des Zusammenwirkens der verschiedenen Typen schwacher Wechselwirkungen ist nur möglich, wenn die thermodynamischen Parameter des Systems bekannt sind. Die wichtigsten thermodynamischen Systemparameter sind die Umwandlungsenthalpie und die Umwandlungsentropie sowie zusätzliche Kenngrößen, durch die das Ausmaß der Kooperativität einer Konformationsumwandlung beschrieben wird. Wenn die betrachtete Umwandlung mit der Freisetzung niedermolekularer Liganden gekoppelt ist, müssen auch die entsprechenden Bindungsenthalpien und Bindungsentropien bestimmt werden.

Auch die in wässriger Suspension als Lipidmatrix-Modellsysteme vielfach untersuchten Phospholipid-Doppelschichtvesikel^[6] gehen bei Überschreitung einer charakteristischen

Umwandlungstemperatur aus dem quasikristallinen Gelzustand in einen weniger geordneten flüssigkristallinen Zustand über. Diese durch eine Verringerung der Packungsdichte und eine Zunahme der Molekülkettenbeweglichkeit ausgezeichnete Umwandlung vollzieht sich ebenfalls innerhalb eines eng begrenzten Temperaturintervalles. Dieser kooperative Prozeß wird als Lipid-Phasenumwandlung bezeichnet^[7]. Die charakteristische Umwandlungstemperatur hängt nicht nur vom Zustand der polaren Phospholipid-Kopfgruppen, sondern auch von der Kettenlänge und der Anzahl der Doppelbindungen der Lipid-Kohlenwasserstoffketten ab. Das Phasenumwandlungsverhalten der Lipiddoppelschichten wird auch durch Zusätze anderer Mischungskomponenten (z. B. Cholesterin) beeinflusst. In Lipidsystemen mit geringem Wassergehalt treten neben den einfach gebauten Doppelschichtvesikeln noch andere Lipidaggregate mit komplexen Ordnungsmustern auf. Die Existenzbereiche dieser „Phasen“ können durch ein Lipid-Phasendiagramm beschrieben werden. Voraussetzung für eine Interpretation der an Lipidsystemen beobachteten Erscheinungen auf molekularer Ebene ist die Kenntnis der thermodynamischen Gleichgewichtsparameter dieser Systeme.

Es gibt mehrere Methoden zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter von Biopolymerlösungen und von Phospholipidsystemen. Ausgehend von der Untersuchung einfacher Modellsysteme wurde ein umfangreiches experimentelles Datenmaterial erarbeitet, das in neuerer Zeit kritisch gesichtet und in Übersichtsartikeln^[8, 9] und Datensammlungen^[10] zusammenfassend dargestellt ist. Es ist nicht möglich, das gesamte Datenmaterial im Rahmen dieses Aufsatzes vollständig zu referieren. Die Zielsetzung dieses Beitrages besteht vielmehr darin, die in den Abschnitten 4 und 5 beschriebene kalorimetrische Methode als ein für die Untersuchung von Biopolymeren und Phospholipidsystemen wichtiges Meßverfahren vorzustellen und die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse an einigen typischen Beispielen zu erläutern.

2. Umwandlungsgrad und Umwandlungsenthalpie

Das einfachste Modellsystem für eine Biopolymerlösung mit temperaturabhängigem Helix-Knäuel-Gleichgewicht ist ein Ensemble von Homopolypeptidmolekülen gleicher Kettenlänge. Die Peptideinheiten dieser Moleküle werden als „Segmente“ bezeichnet. Bei Vernachlässigung kooperativer Wechselwirkungseffekte läßt sich dieses System durch ein Zwei-Zustände-Gleichgewicht (Segment im α -Helixzustand (B) \rightleftharpoons Segment im Knäuelzustand (A)) beschreiben. Der im Helixzustand befindliche Bruchteil der Segmentgesamtheit wird als Helixbildungsgrad θ bezeichnet^[1-3]. Die Helixbildungskonstante s ist die Massenwirkungskonstante für den Prozeß



Der Temperaturverlauf der Größe $1 - \theta$ ist im oberen Teil von Abbildung 2 skizziert. Man bezeichnet die dem Umwandlungsgrad $\theta_m = 0.5$ zuzuordnende Temperatur T_m (oder die entsprechende Temperatur ϑ_m der Celsius-Skala) als Umwandlungstemperatur. Wenn keine kooperativen Wechselwirkungen zu berücksichtigen sind, ergibt sich die typische Kurvenform der Funktion $1 - \theta(T)$ unmittelbar

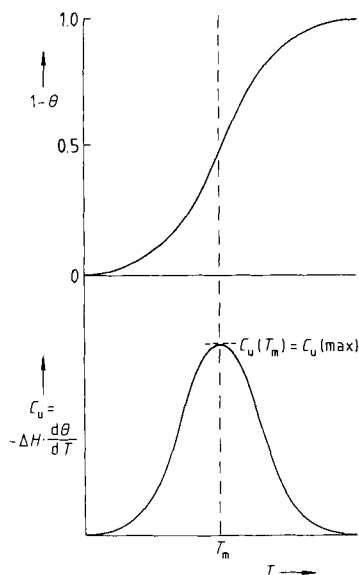


Abb. 2. Temperaturverlauf des Umwandlungsgrades $1-\Theta$ (oben) und des Umwandlungsanteils der Wärmekapazität C_u (unten) einer thermisch induzierten Helix-Knäuel-Umwandlung nach Gl. (3) bzw. Gl. (7).

aus der Temperaturabhängigkeit der Massenwirkungskonstante s , die nach den Gesetzen der Thermodynamik durch die Gleichung

$$\frac{d \ln s}{dT} = \frac{\Delta H_{v.H.}}{RT^2} \quad (2)$$

gegeben ist. In Gleichung (2) ist $\Delta H_{v.H.}$ die auf ein mol der Segmenteinheit bzw. auf ein mol Lipid bezogene van't Hoffsche Helixbildungs- bzw. Umwandlungsenthalpie. Am Umwandlungspunkt ist $s = 1$ und $\Theta(1 - \Theta) = 1/4$. Für T_m ergibt sich damit unter den genannten vereinfachenden Voraussetzungen die Gleichung^[3]

$$\left(\frac{d(1 - \Theta)}{dT} \right)_{T_m} = - \frac{\Delta H_{v.H.}}{4RT_m^2} \quad (3)$$

Nach Gleichung (3) kann $\Delta H_{v.H.}$ aus der Steigung der mit optischen Methoden registrierten Umwandlungskurve entnommen werden.

Durch den Helix-Knäuel-Übergang wird die Anlagerung von Lösungsmittelmolekülen an die gelösten Polypeptidmoleküle (Solvatation) begünstigt. Die Solvatation ist ein exothermer Prozeß. Mit dem Solvatationszustand des Gelösten ändert sich auch der Assoziationszustand des Lösungsmittels. Der Gesamtprozeß der Helix-Knäuel-Umwandlung ist also ein Vorgang, bei dem sich endotherme und exotherme Teilprozesse überlagern und in der Energiebilanz bis auf einen relativ geringfügigen Differenzbetrag kompensieren. Die für ein Peptidsegment mit einer mittleren Wasserstoffbrückendissoziationsenergie^[11] von 30 kJ mol^{-1} zu berechnende molare Umwandlungsenthalpie kann daher nicht wesentlich größer als 5 kJ mol^{-1} sein. Für ein eingehend untersuchtes Peptidsystem (Poly(γ -benzyl-L-glutamat)^[12, 13], gelöst in einer Mischung aus Dichloressigsäure und 1,2 Dichlorethan, siehe Abschnitt 7.1) hat sich jedoch bei der Auswertung von Umwandlungskurven ein sehr viel höherer $\Delta H_{v.H.}$ -Wert (etwa 400 kJ mol^{-1}) ergeben. Offenbar ist die Vernachlässigung des stabilisierenden Einflusses der

Nachbarsegmente einer Polypeptidkette nicht zulässig, da die Bildung einer Helixsequenz durch die unmittelbare Nachbarschaft von bereits im Helixzustand vorliegenden Segmenten stark begünstigt wird. Diese Begünstigung bedeutet, daß die benachbarten Segmente einer Helixsequenz der Polypeptidkette kooperativ aus dem Knäuelzustand in den Knäuelzustand übergehen. Der Einfluß der Kooperativität macht sich in der ausgeprägten Steilheit der Umwandlungskurven bemerkbar.

3. Kooperativitätsparameter und mittlere kooperative Länge

Die theoretischen Ansätze^[1-3, 13], mit denen eine quantitative Beziehung für die Temperaturabhängigkeit der Häufigkeit und Nachbarschaftsverteilung von Segmenten im Helix- oder Knäuelzustand hergeleitet werden kann, führen übereinstimmend zu einer Aussage über die mittlere Anzahl der bei der Temperatur T_m noch in einer Helixsequenz vereinigten Segmente. Die Zahl N_0 der am Umwandlungspunkt kooperativ in den Knäuelzustand übergehenden Segmente wird als mittlere kooperative Länge bezeichnet^[1]. Bei Berücksichtigung der Kooperativität hat man in Gleichung (3) für $\Delta H_{v.H.}$ nicht die wahre molare Umwandlungsenthalpie ΔH_u , sondern das Produkt $N_0 \cdot \Delta H_u$ einzusetzen. Es gilt also die Beziehung

$$H_{v.H.} = N_0 \cdot \Delta H_u \quad (4)$$

denn man hat als molare stöchiometrische Einheit für die kooperative Konformationsumwandlung nicht das einzelne Peptidsegment, sondern die durch N_0 gegebene Anzahl von Segmenten anzusehen. Die Auswertung der z. B. durch Messung der Temperaturabhängigkeit des optischen Drehvermögens ermittelten Umwandlungskurve liefert also stets nur das Produkt $N_0 \cdot \Delta H_u$. In der Regel ist die mittlere kooperative Länge N_0 zunächst nicht bekannt; sie kann oft auch nicht theoretisch berechnet werden, wenn genaue Angaben über die Kettenlänge der untersuchten Polypeptidmoleküle und über deren Einfluß auf die Steilheit der Umwandlungskurve fehlen. In der Theorie der Helix-Knäuel-Umwandlung hat der Kooperativitätsparameter σ eine zentrale Bedeutung. Ist s die Massenwirkungskonstante für den durch Gleichung (1) definierten Wachstumsschritt, so stellt das Produkt $\sigma \cdot s$ die Massenwirkungskonstante für den Keimbildungsschritt



dar ($\sigma < 1$). Applequist^[13] hat gezeigt, daß zwischen dem Kooperativitätsparameter σ und der mittleren kooperativen Länge N_0 die einfache Beziehung

$$N_0 = \sigma^{-1/2} \quad (6)$$

besteht. Für $\sigma = 10^{-4}$ ist z. B. $N_0 = 100$. Wenn der Wert von N_0 nicht bekannt ist, läßt sich mit den bisher beschriebenen Verfahren keine Information über die Größe der auf das Einzelsegment bezogenen wahren molaren Umwandlungsenthalpie ΔH_u gewinnen. Die Kenntnis der ΔH_u -Werte ist jedoch für das Verständnis der die Stabilität einer Sekundärstruktur mitbestimmenden Enthalpiebilanz besonders wich-

tig. Deshalb müssen bei der Bestimmung der ΔH_u -Werte auch direkte kalorimetrische Verfahren Anwendung finden.

Der hier am Beispiel der Helix-Knäuel-Umwandlung eines Polypeptidsystems diskutierte Einfluß der kooperativen Wechselwirkung macht sich in ähnlicher Weise auch bei der thermisch induzierten Denaturierung von Nucleinsäure-Doppelhelix-Struktursequenzen bemerkbar. Deshalb können auch die auf ein mol Basenpaar (bp) zu beziehenden wahren Denaturierungsenthalpien von Poly- oder Oligonucleotiden nur bei Berücksichtigung des Kettenlängeneffektes aus der Steigung der durch Registrierung der UV-Extinktion an Präparaten unterschiedlicher Kettenlänge ermittelten sogenannten „Schmelzkurven“ entnommen werden.

Besonders drastisch wirkt sich der kooperative Effekt auf den Übergang der Lipiddoppelschichtsysteme aus dem Gelzustand in den flüssigkristallinen Zustand aus. Die ausgeprägte Ähnlichkeit dieser Zustandsänderung mit einer Phasenumwandlung 1. Ordnung läßt den Schluß zu, daß dieser Vorgang ein hoch kooperativer Prozeß ist. Bei der physikalisch-chemischen Charakterisierung dieser Systeme kann die exakte Bestimmung der wahren Umwandlungsenthalpie oft nur mit einer direkten kalorimetrischen Messung ausgeführt werden. Die für diese kalorimetrischen Messungen geeigneten Methoden sollen im folgenden erläutert werden.

4. Wahre Umwandlungsenthalpie und Umwandlungsanteil der Wärmekapazität

Bei Beschränkung auf den verhältnismäßig eng begrenzten Temperaturbereich einer kooperativen Konformationsumwandlung kann die molare Umwandlungsenthalpie ΔH als ein konstanter Systemparameter angesehen werden. Da die Gesamtanzahl n_g aller Segmente vorgegeben ist, erhält man mit der differentiellen Molzahländerung $dn = -n_g \cdot d\theta$ und mit dem Enthalpiezuwachs $dh = \Delta H dn$ den einfachen Ausdruck

$$C_u = \frac{1}{n_g} \frac{dh}{dT} = -\Delta H \frac{d\theta}{dT} \quad (7)$$

in dem C_u der auf 1 mol der Segmenteinheit bezogene Umwandlungsanteil der Wärmekapazität ist. Der Temperaturverlauf von C_u ist im unteren Teil der Abbildung 2 schematisch dargestellt. Die symmetrische Kurve veranschaulicht die Proportionalität zwischen dem Betrag von C_u und dem Differentialquotienten $d\theta/dT$. Da die Gesamtumwandlungsenthalpie des Systems nicht von der Art der bei der Zustandsänderung durchlaufenen Zwischenzustände abhängig ist, kann die gesuchte wahre molare Umwandlungsenthalpie ΔH_u durch Ausmessen der Fläche unter der in Abbildung 2 (unten) skizzierten Kurve ermittelt werden. Da die Umwandlungskurve bei der Temperatur T_m ihre größte Steilheit erreicht, hat auch $C_u(T)$ an dieser Stelle ein Maximum. Für T_m erhält man unter Berücksichtigung von Gleichung (4) und (6) die Beziehung

$$C_u(T_m) = \frac{1}{4\sigma^{1/2}} \frac{(\Delta H_u)^2}{RT_m^2} \quad (8)$$

Mit der exakten Registrierung des Temperaturverlaufes der Wärmekapazität einer Lösung von Biopolymeren lassen sich also zunächst die Größen ΔH_u und $C_u(T_m)$ bestimmen.

Durch Einsetzen dieser beiden Größen in Gleichung (8) lassen sich dann auch σ und damit nach Gleichung (6) N_0 berechnen. Voraussetzung für eine exakte Bestimmung des Kooperativitätsparameters ist allerdings eine verzerrungsfreie Wiedergabe der Funktion $C_u(T)$, die nur bei niedriger Aufheizgeschwindigkeit und geringer thermischer Trägheit der Meßanordnung erreicht werden kann.

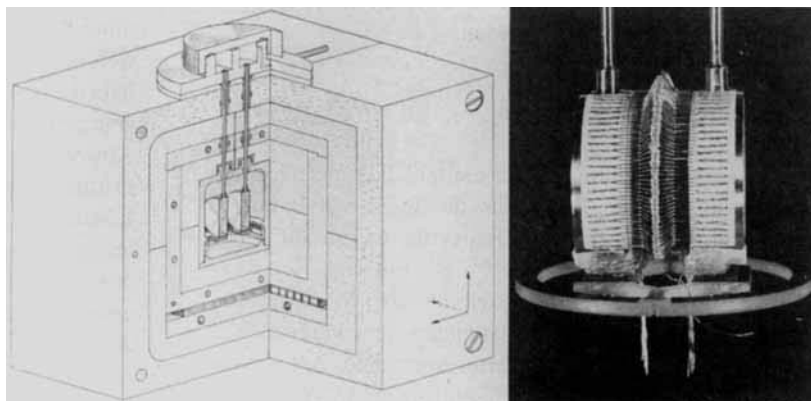
Bei Modellsystemen mit einheitlicher Primärstruktur (Homopolypeptide und -polynucleotide) und einigen Transfer-Ribonucleinsäuren läßt sich die Konformationsumwandlung bei Abkühlung auf dem gleichen Wege rückgängig machen, auf dem sie sich bei Erwärmung eingestellt hat. Auch bei Enzymproteinen sind oft keine Abweichungen bei der Renaturierungsgleichgewichtskurve^[14] zu beobachten. Dagegen läßt sich bei nativen DNA-Proben nach der thermischen Denaturierung eine partielle Renaturierung^[15] nur durch sehr langsames Abkühlen erreichen. Zwischen den Extremen der vollständigen Renaturierbarkeit und der nicht umkehrbaren Denaturierung gibt es eine große Mannigfaltigkeit von hysteresartigen Erscheinungen, deren Bedeutung für einen prinzipiell möglichen Informationsspeichereffekt von *E. Neumann* früher in dieser Zeitschrift ausführlich diskutiert worden ist^[16]. Hystereseeffekte werden bei Variationen des pH-Wertes und bei thermisch induzierten Konformationsumwandlungen einiger Polynucleotidlösungen und Lipidsuspensionen beobachtet. Ein Beispiel für ein Polynucleotidsystem mit thermisch induzierbarer Hysteresis bietet das Mischsystem aus Poly(desoxyriboadenylsäure) (Poly(dA)) und Poly(ribothymidylsäure) (Poly(T))^[17]. Lipidsysteme mit thermischer Hysteresis sind die Phosphatidsäuresysteme^[18]. Der Hystereseeffekt macht sich auch im Verlauf der $C_u(T)$ -Kurven bemerkbar. Bei schneller Gleichgewichtseinstellung eines hysteresefreien Systems muß sich Übereinstimmung der bei Erwärmung und Abkühlung registrierten $C_u(T)$ -Kurven ergeben. Da die Zielsetzung thermodynamischer Messungen in erster Linie in der Charakterisierung von Zustandsänderungen zwischen Gleichgewichtszuständen besteht, sollte grundsätzlich in jedem Fall geprüft werden, ob das untersuchte System bei der betrachteten Konformationsumwandlung eine Folge von Gleichgewichtszuständen durchläuft oder ob es merklich vom Gleichgewicht abweicht. Deshalb verdient auch die Entwicklung von Heiz-Kühl-Kalorimetern^[19], die eine Registrierung der $C_u(T)$ -Kurve bei Erwärmung und bei Abkühlung der Probe gestatten, besondere Beachtung. Bei Konstanz der Enthalpiefläche unter der $C_u(T)$ -Kurve ist das Problem der verzerrungsfreien Wiedergabe dieser Kurve von untergeordneter Bedeutung, wenn nur die ΔH_u -Werte ermittelt werden sollen.

5. Experimentelles

Erste Messungen an Lösungen von Polypeptiden^[20] und Polynucleotiden^[21] sind mit registrierenden adiabatischen Kalorimetern durchgeführt worden. Für spezielle Messungen an einigen nichtwäßrigen korrosiven Lösungen mußten aus Glas gefertigte Kalorimetergefäße^[22, 23] verwendet werden. Messungen an wäßrigen Lösungen lassen sich in den meisten Fällen mit Metall-Kalorimetergefäßen (z. B. vergoldeten Silbergefäßen^[24]) durchführen. Zur Registrierung von $C_u(T)$ -Kurven ist die DSC-Methode (Differential Scanning Calorimetry) am besten geeignet^[25]. Das Prinzip dieser

Zwillingskalorimeter-Methode (Registrierung der zur Kompensation des Umwandlungsanteils der Wärmekapazität erforderlichen elektrischen Zusatzheizleistung bei weitgehender Ausschaltung des Wärmeaustausches mit der Umgebung) ist bekannt und in der neueren Spezialliteratur über Meßverfahren der Kalorimetrie^[26] ausführlich beschrieben.

Abb. 3. Konstruktionsschema (links) und Zwillingsgefäßeinheit (rechts) eines DPSC-Gerätes (nach M. Grubert^[29]). Die an den Einfüllkanälen fixierte Zwillingsgefäßeinheit ist von einem über Thermosäulen regelbaren adiabatischen Mantel umgeben. Eine konstante Umgebungstemperatur wurde durch einen mit Peltier-Batterien thermostatisierten Außenmantel, der den mit der Gefäßeinheit aufgeheizten adiabatischen Mantel umgibt, aufrechterhalten (Äußerer Schutzabschluß: Aluminiumblock mit druckfester Verschlusskappe; Auskleidung der Zwischenräume zwischen den Mänteln: Polyurethanschaum-Formstücke).



Von den im Handel angebotenen DSC-Apparaturen eignen sich jedoch nur einige spezielle Gerätetypen für Messungen an Lösungen von Biopolymeren und analogen Modellsustanzen. Besondere Anforderungen an die Empfindlichkeit ergeben sich zwangsläufig aus der Tatsache, daß der Hauptanteil der bei der thermisch induzierten Konformationsumwandlung zu beobachtenden Enthalpiezunahme nicht durch die Strukturumwandlung des Gelösten, sondern durch die hohe Wärmekapazität des in großem Überschuß vorhandenen Lösungsmittels verursacht wird. Während der durch eine Strukturumwandlung bedingte Enthalpiezuwachs bei der Untersuchung homogener fester Proben (z. B. fester Polymerwerkstoffe) einen beträchtlichen Anteil der Gesamtwärmekapazität ausmacht, beträgt der hier in erster Linie interessierende Umwandlungsanteil der Wärmekapazität von Biopolymerlösungen in der Regel nicht mehr als ein bis zwei Prozent des kalorimetrisch meßbaren Gesamteffektes. Deshalb muß die Nachweisempfindlichkeit für den zu ermittelnden Differenzeffekt auch dann besonders hoch sein, wenn der auf das Lösungsmittel zurückzuführende Hauptanteil der Wärmekapazität durch Kompensation nach dem Zwillingskalorimeter-Prinzip eliminiert wird. Außerdem können wegen der Flüchtigkeit des Lösungsmittels nur DSC-Apparaturen mit hermetisch verschließbaren Probenkammern für kalorimetrische Messungen an Lösungen von Biopolymeren verwendet werden.

Den genannten Anforderungen genügt das von P. Privalov et al.^[27] entwickelte, mit Goldgefäßen ausgestattete Kalorimeter DASM-1M (Mashpriborintorg, Moskau, UdSSR), von dem jetzt auch eine verbesserte Ausführung (DASM-4M) verfügbar ist. Mit diesem Gerätetyp können Messungen an Biopolymerlösungen relativ geringer Konzentration ($1-2 \text{ mg mL}^{-1}$) ohne besondere Schwierigkeiten durchgeführt werden. Auch das von J. F. Brandts et al.^[28] entwickelte Gerät Microcal MC1 (Microcal Inc., Amherst, MA, USA) eignet sich für Messungen an Biopolymerlösungen. Für Untersuchungen an konzentrierten Lipidsuspensionen (5–10 Gew.-%) können auch die Perkin-Elmer-DSC-Geräte (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA) verwendet

werden. Bei diesen Geräten wirkt sich jedoch das geringe Probenvolumen (20 bis 50 μL) ungünstig auf den kalorimetrisch meßbaren Effekt aus. Angesichts des nicht sehr umfangreichen Angebotes an geeigneten Geräten ist die Weiterentwicklung von DSC-Geräten für den genannten Zweck sinnvoll.

Abbildung 3 zeigt das Konstruktionsschema und die Zwillingsgefäßeinheit eines von M. Grubert^[29] im Freiburger Institut entwickelten DPSC-Gerätes (Differential Power Scanning Calorimeter). In Abbildung 4 ist als Beispiel die

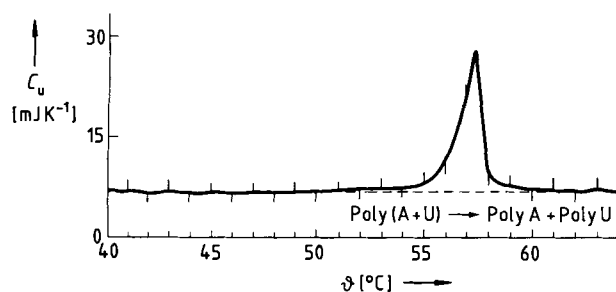


Abb. 4. Mit einem DPSC-Gerät registrierte $C_p(T)$ -Kurve eines Polynucleotidsystems (äquimolare Mischung aus Polyribouridylat und Polyriboadenylat in wäßriger Pufferlösung; vgl. Abschnitt 6).

mit einem derartigen Gerät aufgenommene $C_p(T)$ -Kurve einer Polynucleotidlösung wiedergegeben^[30]. Da der aus der Fläche unter der $C_p(T)$ -Kurve zu entnehmende ΔH_u -Wert nur einem kleinen Differenzeffekt zweier durch Kompensation eliminierten endothermer Effekte entspricht, kann man nicht erwarten, daß diesem ΔH_u -Wert eine besonders hohe Relativgenauigkeit zuzuschreiben ist. In der Regel sind die mit der DSC-Methode ermittelten ΔH_u -Werte bis auf $\pm 2\%$ reproduzierbar. Diese Genauigkeit hat sich in den meisten Fällen, in denen thermodynamische Daten für numerische Berechnungen benötigt werden, als ausreichend erwiesen.

Zur thermodynamischen Charakterisierung von Biopolymersystemen mit Ligandenbindung^[31] sollte nach Möglichkeit eine direkte kalorimetrische Bestimmung der Bindungsenthalpie durchgeführt werden. Für Experimente dieser Art eignet sich das LKB-Mischungskalorimeter^[32] des Typs 10700-2 (LKB, Bromma, Schweden). Entsprechende Messungen wurden von mehreren Forschergruppen durchgeführt^[33].

6. Ergebnisse von Messungen an Polynucleotidlösungen

Kalorimetrische Messungen an Lösungen von Nucleinsäuren und synthetisch hergestellten Poly- und Oligonucleotiden sind in großer Zahl durchgeführt worden. Die Ergebnisse sind in der zitierten Datensammlung^[10] zusammenfassend dargestellt. Einige typische Beispiele sollen hier kurz beschrieben und diskutiert werden.

6.1. Desoxyribonucleinsäuren

Die Größenordnung der auf ein mol Basenpaare (1 mol bp) bezogenen ΔH_u -Werte für die thermisch induzierte Denaturierung von gelösten Desoxyribonucleinsäuren liegt im Bereich von 35 kJ/mol bp^[34–37]. Für eine Reihe von DNA-Proben ist die Abhängigkeit der ΔH_u -Werte vom prozentualen Guanin-Cytosin-Gehalt untersucht worden^[38, 39]. Aus den für mehrere T_m -Werte ermittelten ΔH_u -Werten konnten auch die Denaturierungsentropien (ΔS_u -Werte) und die ΔG_u -Werte berechnet und in Zustandsdiagrammen zusammengefaßt werden^[10]. Die ΔH_u -Werte nehmen mit steigendem GC-Gehalt der untersuchten Proben zu (vgl. Abb. 5); sie zeigen also eine T_m -Abhängigkeit, die der von

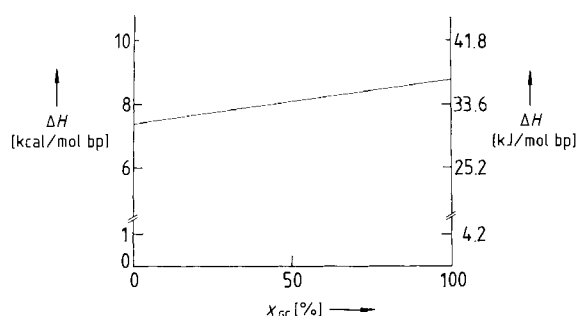


Abb. 5. Abhängigkeit der DNA-Denaturierungsenthalpie ΔH_u vom Guanin-Cytosin-Gehalt x der Proben [34, 39].

Marmur und Doty^[5] festgestellten Abhängigkeit der T_m -Werte vom GC-Gehalt der DNA-Proben entspricht.

Exakte Meßwerte der Denaturierungsenthalpie können demnach als zusätzliches analytisches Kriterium für die relative Basenzusammensetzung von DNA-Proben verwendet werden. Die Abhängigkeit der ΔH_u -Werte vom GC-Gehalt ist allerdings nicht so ausgeprägt wie man es bei einer ausschließlich durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierten Doppelhelixstruktur erwarten sollte. Aus der Gesamtheit der an DNA-Proben gemessenen ΔH_u -Werte läßt sich ableiten, daß der Wasserstoffbrücken-Enthalpieeffekt keinen besonders großen Beitrag zur Stabilisierung der Sekundärstruktur liefert und daß die Doppelhelixstruktur in erster Linie durch Wechselwirkungen zwischen den übereinanderliegenden Basen (Basenstapelung) stabilisiert wird. Dieser Befund wird verständlich, wenn man beachtet, daß bei der Denaturierung solvatisierte Einzelstränge entstehen. Die in der Übersichtstabelle (Tabelle 2) im Abschnitt 9 für den Teilprozeß der Basen-Entstapelung angegebenen ΔH -Werte betragen etwa 25 kJ/mol bp. Aus dem Vergleich mit der Angabe für die Größenordnung der DNA-Denaturierungsenthalpie (35 kJ/mol bp) ergibt sich, daß etwa 70% des

gesamten Enthalpieeffektes der Doppelhelixdenaturierung auf die Basen-Entstapelung zurückzuführen sind. Die Wasserstoffbrückensysteme sind vor allem für die Spezifität der Basenpaarung und erst in zweiter Linie für die Stabilität der Sekundärstrukturen wichtig.

Bei der Diskussion der ΔH_u -Werte ist zu beachten, daß sich die Angaben thermodynamischer Daten gelöster Elektrolyte in der Regel auf den Standardzustand idealer Verdünnung beziehen^[40]. Kalorimetrische Messungen an Polynucleotidlösungen verschiedener Polynucleotidkonzentration haben ergeben, daß die ΔH_u -Werte dieser Substanzen nur eine geringe Konzentrationsabhängigkeit aufweisen^[41]. Die Abweichungen der auf den Zustand idealer Verdünnung extrapolierten ΔH_u^0 -Werte von den an mäßig konzentrierten Lösungen gemessenen ΔH_u -Werten liegen innerhalb der angegebenen Fehlergrenze von $\pm 2\%$. Die experimentell ermittelten ΔH_u -Werte können deshalb als Standardwerte erster Näherung bezeichnet werden. Diese vereinfachende Annahme hat sich bis jetzt jedoch nur für wäßrige Polynucleotidlösungen als gültig erwiesen.

Durch Messungen an ausgewählten DNA-Proben konnte gezeigt werden, daß sich die DSC-Methode auch als zusätzliches Hilfsmittel zur Charakterisierung hochrepetitiver Sequenzen in Eukaryonten-DNA verwenden läßt. Die in bestimmten Satelliten-DNAs auftretenden Wiederholungssequenzen können diskreten Peaks im $C_u(T)$ -Diagramm der untersuchten Proben zugeordnet werden. Aus den mit dieser Methode ermittelten T_m -Werten kann die mittlere Basenzusammensetzung der Wiederholungssequenzen entnommen werden^[42].

6.2. Ribonucleinsäuren

Die für die Proteinbiosynthese unerläßlichen spezifischen Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNAs) weisen ein charakteristisches Basenpaarungsmuster (Kleeblatt-Modell) und eine besondere Tertiärstruktur auf (vgl. Abb. 6); sie unterschei-

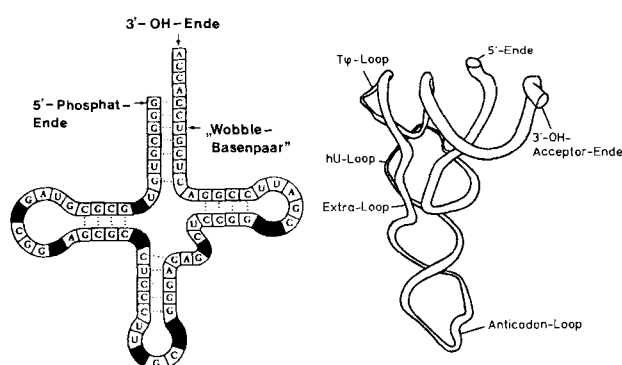


Abb. 6. Vereinfachte Darstellung der Sekundärstruktur ($tRNA^{Ala}$, links) und der Tertiärstruktur ($tRNA^{Phe}$, rechts) von Transfer-Ribonucleinsäuren.

den sich nur wenig in ihrem Molekulargewicht. Die mit verschiedenen physikalisch-chemischen Methoden^[43] ermittelte Zahl der Basenpaare läßt jedoch charakteristische Unterschiede in der Sekundärstruktur verschiedener spezifischer tRNAs erkennen. Bei der weitgehend umkehrbaren thermisch induzierten Denaturierung gelöster tRNA-Proben überlagern sich die endothermen Abbauprozesse der Tertiär-

und der Sekundärstruktur^[44, 45]. Trotz dieser Überlagerung zweier Effekte konnte bei kalorimetrischen Messungen an Lösungen verschiedener spezifischer tRNAs^[46] eine signifikante annähernd lineare Abhängigkeit der Denaturierungsenthalpien von der durch die Sekundärstruktur vorgegebenen Zahl der Wasserstoffbrückenbindungen festgestellt werden. Die Größenordnung der auf 1 mol tRNA bezogenen ΔH_u -Werte für die Denaturierung der tRNA-Proben beträgt etwa 1500 kJ mol^{-1} . Dieser Wert entspricht einer mittleren Basenpaarzahl^[43] von etwa 20 Basenpaaren und ist damit wesentlich höher als die berechneten Werte, die unter Verwendung der in Tabelle 2 (Abschnitt 9) angegebenen Basenpaar-Denaturierungsinkremente abgeschätzt werden können^[46]. Demnach muß ein beträchtlicher Anteil (etwa 30%) der gesamten Umwandlungsenthalpie einer tRNA-Probe für die Denaturierung der Tertiärstruktur aufgewendet werden.

Viroide sind zirkuläre Einzelstrang-Ribonucleinsäuren (Molekulargewicht etwa 120 000), die als infektiöse Partikel eine Reihe von Pflanzenkrankheiten hervorrufen^[47]. Aus den Ergebnissen von Präzisionsmessungen des Temperaturverlaufs der UV-Extinktion gelöster Viroide konnten detaillierte Aussagen über die Sekundärstruktur dieser Ribonucleinsäuren abgeleitet werden^[48]. Das dem Denaturierungsverhalten der Viroid-Proben angepaßte Modell der Sekundärstruktur^[49] bildet die Grundlage für eine Abschätzung der Denaturierungsenthalpie, die mit den in diesem Aufsatz beschriebenen Methoden kalorimetrisch bestimmt werden kann. Für das die Gelbfrüchtigkeit der Gurken hervorrufende CPFV (Cucumber Pale Fruit Viroid) wurde mit der DPSC-Methode eine Denaturierungsenthalpie von $3930 \pm 150 \text{ kJ mol}^{-1}$ gemessen^[50]. Dieser Wert stimmt mit dem aus dem Sekundärstrukturmodell abgeleiteten Wert von 4080 kJ mol^{-1} recht gut überein. Mit dieser Übereinstimmung ist eine notwendige Bedingung dafür erfüllt, daß das von Riesner et al.^[49] vorgeschlagene Modell die Sekundärstruktur des CPFVs im wesentlichen richtig wiedergibt.

6.3. Modell-Poly- und Oligonucleotide

Die Doppelhelix-Knäuel-Umwandlung äquimolarer Mischungen komplementärer Homopolyribonucleotide ist durch eine hohe Kooperativität ausgezeichnet und einer Untersuchung mit den beschriebenen kalorimetrischen Meßmethoden leicht zugänglich. Als Beispiel sei hier das eingehend untersuchte System einer wäßrigen Lösung von Polyriboadenylat (Poly A) und Polyribouridylat (Poly U) genannt^[21, 30, 51, 52]. Auch die Bildung und der thermisch

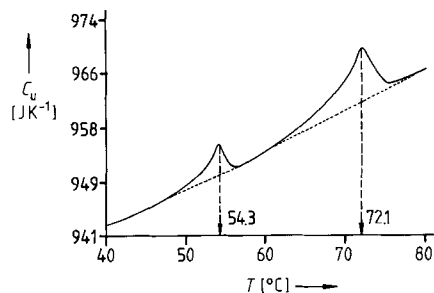
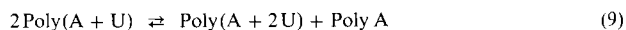
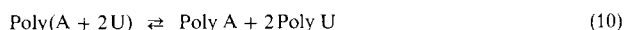


Abb. 7. $C_v(T)$ -Kurve einer äquimolaren Mischung (0.0078 M) von Polyriboadenylat (Poly A) und Polyribouridylat (Poly U). Die Versuchsbedingungen sind im Text angegeben.

induzierte Abbau von Tripelhelices läßt sich durch Messungen an diesem System gut verfolgen. In Abbildung 7 ist die bei pH 6.8 und einer Na^+ -Ionenkonzentration von 0.5 mol L^{-1} aufgenommene $C_v(T)$ -Kurve wiedergegeben. Der Umwandlungspeak bei 54.3°C entspricht der „Disproportionierung“ nach dem Schema



Bei der Umwandlung wird also zunächst unter Freisetzung von einem Äquivalent Poly A eine Tripelhelix^[30] der Zusammensetzung $\text{Poly}(\text{A} + 2\text{U})$ gebildet. Das ausgeprägte Maximum der Wärmekapazität bei 72.1°C entspricht einer Umwandlung, bei der die Komponenten Poly A und Poly U nach dem Schema



aus dem Tripelhelix-Komplex freigesetzt werden. Auch das Modellsystem $\text{Poly}(\text{I} + \text{C})$, d.h. eine äquimolare wäßrige Mischung aus Polyriboinosylat (Poly I) und Polyribocytidylat (Poly C) ist kalorimetrisch eingehend charakterisiert worden^[53].

Aus den einer Doppelhelixdenaturierung zuzuordnenden ΔH_u -Werten von Polynucleotidsystemen lassen sich Aussagen über die relative Stabilität verschiedener komplementärer Basenkombinationen ableiten, da sich die korrespondierenden Umwandlungsentropien nur wenig unterscheiden^[10]. So fügt sich z. B. der für alternierendes Poly d(A–T) ermittelte ΔH_u -Wert^[54] von 30 kJ/mol bp gut in das in der Erläuterung zu Abbildung 5 beschriebene Datensystem ein. In diesem Zusammenhang sind auch die Versuche zur thermodynamischen Charakterisierung des von Crick^[55] postulierten „Wobble-Basenpaares“ GU (vgl. z. B. Abb. 6 links) zu erwähnen^[56]. Durch spektroskopische und kalorimetrische Messungen an äquimolaren wäßrigen Mischungen von Poly(A, G) mit Poly U (und von Poly(C, U) mit Poly G) konnte gezeigt werden, daß sich der für die Basenkombination Guanin-Uracil ermittelte ΔH_u -Wert mit 28 kJ/mol bp nur wenig vom Wert für das AU-Basenpaar (33 kJ/mol bp) unterscheidet. Die unterschiedlichen Stabilitäten der beiden Basenkombinationen kommen in diesem Falle in den verschiedenen Werten der Umwandlungsentropien^[56] zum Ausdruck. Bei der Standardtemperatur von 25°C werden die Ribonucleotidsekundärstrukturen auch durch die Basenkombination Guanin-Uracil stabilisiert, obwohl diese Basenkombination durch eine besonders hohe dynamische Flexibilität ausgezeichnet ist^[57]. Das bei der Umwandlung nach Gleichung (9) freigesetzte Poly A liegt nicht in der Knäuelform, sondern in einer partiell geordneten Sekundärstruktur vor. Die dem thermisch induzierten Abbau dieser Sekundärstruktur zuzuordnende Umwandlungsenthalpie konnte ebenfalls durch kalorimetrische Messungen bestimmt werden^[10]. Bei der Ermittlung von Doppelhelixdenaturierungsenthalpien müssen die durch Sekundärstrukturumwandlungen einsträngiger Polynucleotide bedingten Enthalpieänderungen in jedem Falle berücksichtigt werden.

Die Bedeutung der thermodynamischen Charakterisierung von Oligonucleotidsystemen^[58] besteht darin, daß diese Systeme eine besonders gute Grundlage für das Studium des Einflusses bestimmter Basensequenzen auf die relative Stabilität verschiedener möglicher Sekundärstruk-

turelemente (z. B. Hairpin-Loops, vgl. Abb. 6) bieten. Sequenzspezifische Effekte sind bei der Untersuchung kurzer Oligonucleotidsequenzen besser zu erfassen als beim Studium der Eigenschaften von Polynucleotiden. Mit einem geeigneten Satz thermodynamischer Oligonucleotidparameter läßt sich die Stabilität bestimmter Sekundärstrukturmodelle (z. B. von Viroiden) abschätzen. Durch Messungen an Oligonucleotidsystemen konnte gezeigt werden, daß sich die Basenstapelungsenthalpien gleicher Basenpaare von Ribonucleotiden und Desoxyribonucleotiden nicht wesentlich unterscheiden^[58]. Auch der stabilisierende oder destabilisierende Einfluß überstehender Einzelstrangabschnitte (dangling ends) auf die Stabilität der Helixstrukturen läßt sich durch Denaturierungsexperimente an Lösungen doppelhelicaler Oligonucleotidkomplexe quantitativ erfassen^[59]. Dabei ist zu beachten, daß auch bei extrem hoher Kooperativität nur mit einer relativ geringen Steigung der Umwandlungskurven zu rechnen ist, da die mittlere kooperative Länge (vgl. Gleichung (4)) nicht größer als die Sequenzlänge des Moleküls sein kann. Aus dem gleichen Grunde werden bei kalorimetrischen Messungen an Oligonucleotidsystemen nur breite und flache $C_p(T)$ -Kurven erhalten. Die für eine kalorimetrische Bestimmung einzusetzende Substanzmenge ist daher wesentlich größer als bei Messungen an Polynucleotidsystemen. Trotz dieses Nachteils sollte bei der Untersuchung von Oligonucleotidsystemen stets eine kalorimetrische Messung durchgeführt werden, wenn eine hinreichend große Substanzmenge verfügbar ist. Der kalorimetrisch gemessene ΔH_v -Wert ist unabhängig von der Art des Modells (Zwei-Zustände-Modell oder Mehrschritt-Modell), das bei der Auswertung der Umwandlungskurven vorausgesetzt werden muß. Ein Prozeß, der dem einfachen Zwei-Zustände-Modell entspricht, liegt vor, wenn die kalorimetrisch gemessene molare Gesamtumwandlungsenthalpie mit der aus der Umwandlungskurve abgeleiteten van't Hoffschen Umwandlungsenthalpie $\Delta H_{v,H}$ übereinstimmt. Dies trifft z. B. für das von *Breslauer et al.*^[60] untersuchte Desoxyribonucleotidsystem $d(GC)_3$ ($\Delta H_{v,H} = 240 \text{ kJ mol}^{-1}$) zu. Ist dagegen $\Delta H_{v,H}$ kleiner als die kalorimetrisch gemessene Gesamtumwandlungsenthalpie, so durchläuft das System bei der thermisch induzierten Helix-Knäuel-Umwandlung eine Folge von mehreren Zwischenzuständen (Beispiel rA_7U_7 ^[61]). Weitere Meßdaten und experimentelle Einzelheiten wurden schon früher zusammengefaßt^[58].

6.4. Ligandenbindung (Intercalation)

Ein typisches Beispiel für die Wechselwirkung von gelösten Biopolymeren mit niedermolekularen Liganden ist die Bindung von Ethidium- und Acridin-Farbstoffen an Desoxyribonucleinsäuren. Dabei sind die nichtkompetitiv gebundenen Liganden (Farbstoff-Kationen) durch Intercalation^[62, 63] weitgehend von ihrer Umgebung abgeschirmt. Dagegen werden die kompetitiv (extern) gebundenen Liganden durch Kompetitorsalz-Ionen aus ihrer Bindung verdrängt. Beide Bindungsarten unterscheiden sich durch die Größe der Bindungskonstanten, wobei die externe Bindung durch einen größeren Betrag der Standardbindungsentropie begünstigt ist. In den aus der Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstanten abgeleiteten van't-Hoff-Bindungsenthalpien (-30 kJ mol^{-1}) stimmen beide Bindungstypen

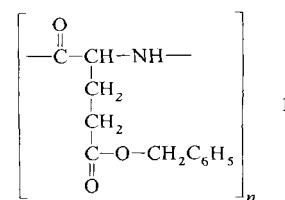
überein. Zur thermodynamischen Charakterisierung der Bindung von Farbstoffen an Desoxyribonucleinsäuren sind von *H. Zimmermann et al.* systematische Untersuchungen mit physikalisch-chemischen Methoden durchgeführt worden^[64]. Die Ligandenbindungsenthalpien können bei Verwendung eines geeigneten Mischungskalorimeters auch kalorimetrisch bestimmt werden, und die so ermittelten ΔH -Werte stimmen unter vergleichbaren Bedingungen recht gut mit den aus Bindungsstudien abgeleiteten Werten überein. Diese Übereinstimmung ist deshalb bemerkenswert, weil sich bei der Berechnung der formalen Standardbindungsenthalpie^[64] aus der Temperaturabhängigkeit von Bindungskonstanten oft aus der Komplexität des Bindungsverhaltens resultierende Schwierigkeiten ergeben können. Die kalorimetrisch bestimmten formalen Standardbindungsenthalpien sind temperaturabhängig^[31]. Diese („scheinbare“) Temperaturabhängigkeit ist in erster Linie auf die Überlagerung der beiden oben genannten Bindungsprozesse und den damit zusammenhängenden Einfluß der Elektrolyt- bzw. Pufferdissoziationsgleichgewichte zurückzuführen. Detailliert wurden diese temperaturabhängigen Bindungsgleichgewichte andernorts diskutiert^[31, 64].

7. Ergebnisse von Messungen an Polypeptid- und Proteinlösungen

Die Ergebnisse der Messungen von Proteindenaturierungsenthalpien sind beschrieben und in Tabellen zusammengefaßt worden^[65]. Einige wesentliche Gesichtspunkte dieser Untersuchungen sollen hier anhand einiger Beispiele erläutert werden.

7.1. Polypeptidsysteme

Ein Polypeptidsystem, an dem von mehreren Autoren^[22, 66] exakte kalorimetrische Messungen ausgeführt worden sind, ist die Lösung von Poly(γ -benzyl-L-glutamat) **1**



in einer Mischung aus Dichloressigsäure und 1,2-Dichloräthan. Das nichtwäßrige Lösungsmittelgemisch mit der stark solvatisierenden Komponente Dichloressigsäure wurde gewählt, weil bei der Untersuchung dieses Modellsystems relativ einfache Bedingungen für die Polypeptid-Lösungsmittel-Wechselwirkung (quasi-stöchiometrische Solvation) vorausgesetzt werden konnten. Eine Besonderheit dieses bereits von *Zimm, Doty* und *Iso*^[4] eingehend untersuchten Systems besteht darin, daß die Bildung der Polypeptid- α -Helix (vgl. Abb. 1) durch eine Erwärmung der Proben begünstigt wird, da bei tieferen Temperaturen überwiegend solvatisierte Polypeptidmoleküle im Knäuelzustand vorliegen. Die Freisetzung der Wasserstoffbrücken-Acceptoren und -Donatoren des Polypeptids durch Abspaltung der Sol-

vensmoleküle (Dichloressigsäuremoleküle) ist also eine notwendige Voraussetzung für die Helixbildung. Deshalb ist der Gesamtvorgang der α -Helixbildung in diesem Lösungsmittelgemisch ein endothermer Prozeß. Bei der thermodynamischen Charakterisierung dieses Polypeptidsystems sind alle Voraussetzungen für eine Anwendung der von Zimm und Bragg^[2] entwickelten Gleichung zur quantitativen Darstellung der Umwandlungskurve gegeben. Für das optische Drehvermögen und die mit einem adiabatischen Kalorimeter^[23] gemessene Wärmekapazität einer Lösung von Poly(γ -benzyl-L-glutamat) **1** (0,257 mol kg⁻¹ Lösungsmittel) in einem Gemisch aus Dichloressigsäure und 1,2 Dichlorethan (81:19) ergibt sich ein Temperaturverlauf, der dem in Abbildung 2 wiedergegebenen Schema entspricht. Die daraus ermittelte Umwandlungsenthalpie ist abhängig von der Konzentration des gelösten Polypeptids^[22]. Der auf den Standardzustand idealer Verdünnung extrapolierte ΔH_u^0 -Wert von 3,99 kJ/mol Segment stimmt gut mit dem aus dem Temperaturverlauf des optischen Drehungsvermögens unter Berücksichtigung der Polymerkettenlänge ermittelten ΔH_u -Wert überein. Aus dem Maximalwert des Umwandlungsanteils der Wärmekapazität konnte für dieses System auch der Kooperativitätsparameter σ nach Gleichung (8) berechnet werden. Für den Standardzustand idealer Verdünnung wurde so der Wert $\sigma = 10^{-4}$ ermittelt. Dieser Wert stimmt gut mit dem von Zimm, Doty und Iso^[4] abgeschätzten σ -Wert überein. Auch der Einfluß der Lösungsmittelzusammensetzung auf die Größe der ΔH_u -Werte ist untersucht worden^[67]. Es muß hier noch erwähnt werden, daß sich nicht alle Polypeptidsysteme für eine physikalisch-chemische Charakterisierung mit den Methoden der Kalorimetrie eignen. Die von Engel et al.^[68] eingehend untersuchte Helix-Helix-Umwandlung des Poly(L-prolins) kann z. B. nicht durch eine Temperaturänderung induziert werden ($\Delta H_u \approx 0$).

7.2. Proteine

Die freie Denaturierungsenthalpie der Proteine – die mit der Protein-„Entfaltung“ einhergehende Änderung der Gibbschen Freien Energie – ist eine wichtige Kenngröße für die Beurteilung der Lebensfähigkeit von Organismen unter extremen Bedingungen (Thermophilie, Psychrophilie)^[69]. In diesem Zusammenhang kommt auch der Ermittlung von Denaturierungsenthalpien gelöster Proteine eine grundsätzliche Bedeutung zu^[65, 70]. Die Werte der kalorimetrisch bestimmten Denaturierungsenthalpien erstrecken sich über den Bereich von 1134 kJ mol⁻¹ (Pepsinogen, $M_r = 38000$ g mol⁻¹) bis 97 kJ mol⁻¹ (Tryptophan-Synthase, α -Untereinheit, Mutante-Ser 49, $M_r = 29000$ g mol⁻¹). In der Größe dieser ΔH -Werte kommt die Vielzahl der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Molekülabschnitten zum Ausdruck. Dies gilt insbesondere für Systeme mit Protein-Protein-Assoziation^[71], die ebenfalls thermodynamisch charakterisiert worden sind (Beispiel: Tabakmosaikvirus-Protein (TMVP)^[72]). Bei der Untersuchung der Assoziation oder „Polymerisation“ von Proteinuntereinheiten wurden sowohl positive als auch negative Werte der Standardumwandlungsentropie gefunden^[72].

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Protein-Thermodynamik ist die Protein-Liganden-Wechselwirkung^[73]. Aus der

Vielzahl der untersuchten Ligandenbindungssysteme, die hier nicht im einzelnen erörtert werden können, sind insbesondere fünf Wechselwirkungstypen hervorzuheben^[73]: die Bindung anorganischer Ionen einschließlich der H⁺-Ionen, die Bindung von Denaturierungsmitteln (z. B. Harnstoff)^[74], die Hapten-Antikörper-Wechselwirkung^[75, 76], die Wechselwirkung von Proteinen (z. B. Muskelproteinen) mit ADP und ATP^[77, 78] und die Bindung von NAD⁺ und analogen Liganden an Enzyme (z. B. an Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherzmuskeln)^[79].

Besondere Bedeutung kommt auch der Wechselwirkung zwischen Proteinuntereinheiten^[80] und der Protein-Nucleinsäure-Wechselwirkung^[81] zu. Ein typisches Beispiel für die Wechselwirkung von Proteinuntereinheiten ist die Wechselwirkung zwischen dem S-Peptid und dem S-Protein der Ribonuclease S'^[80].

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bilden die Grundlage für die Überprüfung von Modellvorstellungen über die Struktur-Funktions-Beziehung von Proteinsystemen.

8. Wäßrige Lipidsysteme

Die Diskussion der thermodynamischen Parameter von Lipidsuspensionen muß hier auf die Erläuterung einiger typischer Beispiele beschränkt bleiben. Bezüglich der Messungen an Lipidsystemen mit geringem Wassergehalt sei auf zusammenfassende Darstellungen^[9] und auf die Originalliteratur^[82] verwiesen.

8.1. Umwandlungstemperaturen, Umwandlungsenthalpien, Umwandlungsentropien und scheinbare Molwärmen

In Tabelle 1 sind die thermodynamischen Parameter für 16 Phospholipide mit jeweils zwei gleichen Kohlenwasserstoff-

Tabelle 1. Umwandlungstemperaturen (T_{m1}) und Umwandlungsenthalpien (ΔH_1) der Vorumwandlung sowie Umwandlungstemperaturen, Umwandlungsenthalpien und Umwandlungsentropien (T_{m2} , ΔH_2 bzw. ΔS_2) der Hauptumwandlung von Phospholipiden mit zwei gleichen Kohlenwasserstoffketten in verdünnter wäßriger Suspension (nach A. Blume [9, 83, 84]).

Lipid [a]	T_{m1} [°C]	T_{m2} [°C]	ΔH_1 [kJ mol ⁻¹]	ΔH_2 [kJ mol ⁻¹]	ΔS_2 [J mol ⁻¹ K ⁻¹]
DMPC	15.3	24.0	5.4	27.2	91.5
DPPC	35.5	41.5	6.7	41.9	115.9
DSPC	51.0	54.3	7.5	45.6	139.4
DAPC	62.1	64.1	7.1	51.5	157.4
DBPC		72.5		62.4	180.4
DLPE		30.5		18.0	59.4
DMPE		49.9		27.6	85.4
DPPE		63.9		36.0	106.7
DSPE		72.5		43.9	127.2
DAPE		81.1		51.1	144.4
DLPA (pH 6)		33.5		14.2	46.5
DMPA (pH 6)		52.2		23.8	73.2
DPPA (pH 6)		65.0		33.1	97.9
DMPA (pH 12)		22.4		17.2	58.2
DPPA (pH 12)		43.1		23.9	74.5
DHPC	33.0	43.5	5.9	35.6	111.8
DHPE		68.5		31.8	93.3
DHPA (pH 6)		73.3		29.7	85.8
DHPA (pH 12)		53.8		24.3	74.5

[a] DMPC: Dimyristoylphosphatidylcholin, DHPC: 1,2-Dihexadecyl-*sn*-glycero-3-phospho-cholin, DHPE: 1,2-Dihexadecyl-*sn*-glycero-3-phospho-ethanolamin, DHPA: 1,2-Dihexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphorsäure.

ketten zusammengestellt. Die in der einschlägigen Fachliteratur^[6, 8] fast ausnahmslos verwendeten Kurzbezeichnungen (z. B. DSPC für Distearoylphosphatidylcholin) ergeben sich aus den Trivialnamen der Fettsäuren und der mit der Phosphatgruppe verknüpften Kopfgruppenbestandteile (vgl. auch Fußnote zu Tabelle 1). Mit zunehmender Länge der Kohlenwasserstoffketten erhöhen sich die T_m -Werte und die Umwandlungsenthalpien (ΔH_2).

Abbildung 8 zeigt als Beispiel die unter gleichen Bedingungen bei einer Konzentration von 1 mg mL^{-1} aufgenom-

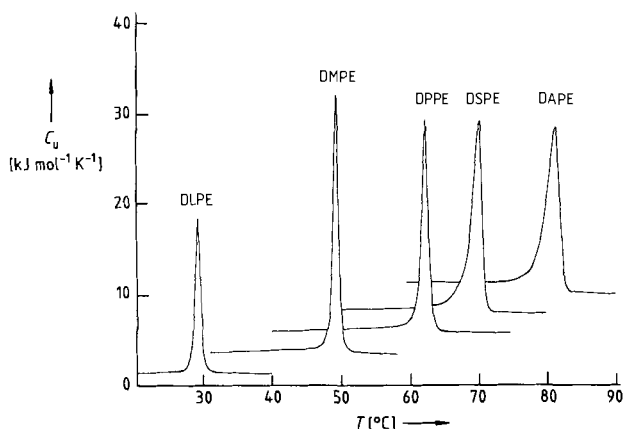


Abb. 8. $C_p(T)$ -Kurven wässriger Suspensionen von fünf Phosphatidylethanolaminen unterschiedlicher Kohlenwasserstoffkettenlänge ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$).

menen DSC-Kurven von wässrigen Suspensionen verschiedener Phosphatidylethanolamine. Auch die in Tabelle 1 aufgeführten Umwandlungsentropien (ΔS_2) weisen einen analogen systematischen Gang auf. Die Beträge dieser ΔS -Werte sind wesentlich niedriger als die Schmelzentropien der entsprechenden langkettigen Fettsäuren oder der entsprechenden reinen Kohlenwasserstoffe. Dieser Befund zeigt deutlich, daß der Ordnungsgrad der Lipiddoppelschichten von Liposomen^[7] in der flüssigkristallinen Phase wesentlich höher als in einer isotropen flüssigen Phase ist. Bei einigen Lipidsystemen (z. B. DPPC) wird eine sogenannte „Vorumwandlung“^[6, 85] beobachtet. Soweit Umwandlungsenthalpien für diese Umwandlung bestimmt werden konnten, sind die entsprechenden Werte (ΔH_1) in Tabelle 1 mit aufgeführt. Die Größe der ΔH_2 -Werte hängt nicht nur von der Länge und dem Sättigungsgrad der Kohlenwasserstoffketten sondern auch von der Art der Phospholipidkopfgruppe ab. Wie ein Vergleich der in Tabelle 1 angegebenen Werte für Distearoylphosphatidylethanolamin (DSPE) und Distearoylphosphatidylcholin (DSPC) zeigt, sind die T_m -Werte der Phosphatidylethanolamine (PEs) höher und die ΔH_2 -Werte niedriger als die entsprechenden Werte der Phosphatidylcholine (PCs) gleicher Kohlenwasserstoffkettenlänge. Dieser Befund, der auch in den unterschiedlichen Werten der Methylengruppeninkremente^[84] der ΔH_2 -Werte zum Ausdruck kommt, deutet darauf hin, daß die PE-Moleküle wegen einer möglichen Wasserstoffbrücken-Verknüpfung der NH_3^+ -Kopfgruppenbestandteile in der flüssigkristallinen Phase dichter als die entsprechenden PC-Moleküle gepackt sind. Zur quantitativen Erfassung des Einflusses der Kopfgruppengröße sind von Hinz et al.^[86] kalorimetrische Messungen an Suspensionen mehrerer synthetischer Glycolipide durchgeführt worden. Bemerkenswert ist auch die Tatsache,

daß bei den in Biomembranen überwiegend vorkommenden Phospholipiden mit zwei verschiedenen Fettsäureketten eine signifikante Abhängigkeit der ΔH_2 -Werte von der Position dieser Fettsäureketten in der Verknüpfung mit dem Glycerinrest zu beobachten ist^[87]. Da die Verbindungslinie der drei Glycerin-C-Atome aus sterischen Gründen nicht parallel zur Oberfläche der Doppelschicht verlaufen kann, verringert sich die Zahl der über die mittelständige Position in die lipophile Zone eingebrachten Methylengruppen um etwa zwei Einheiten (effektive Kettenverkürzung). Damit ergibt sich für MPPC eine lipophile Zone mit einer weitgehend ungestörten Anordnung von Kohlenwasserstoffketten gleicher effektiver Kettenlänge. Für die PMPC-Doppelschicht resultiert dagegen eine Packung von Kohlenwasserstoffketten unterschiedlicher effektiver Länge, die durch einen niedrigen ΔH_2 -Wert charakterisiert ist. Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß mit der DSC-Methode auch die durch die Gleichung

$$\Phi C_p = \frac{C_{p, \text{Mischung}} - n_{\text{H}_2\text{O}} \cdot C_{p, \text{H}_2\text{O}}}{n_{\text{Lipid}}} \quad (11)$$

definierten scheinbaren Molwärmern^[88, 89, 95, 96] bestimmt werden können und daß aus der Größe dieser scheinbaren Molwärmern ebenfalls Aussagen über den Ordnungszustand der Lipidmoleküle abgeleitet werden können^[90, 91, 95, 96]. Beiträge zu den scheinbaren Molwärmern resultieren nicht nur aus der Anregung von inneren Freiheitsgraden der Moleküle, sondern auch aus Wechselwirkungen mit dem umgebenden wässrigen Medium. Die negativen Beiträge kommen durch die Hydratation der polaren Gruppen und die dadurch bedingte Veränderung der Assoziationsstruktur des Wassers^[92] zustande. Zusätzliche positive ΦC_p -Anteile können in der Regel auf die hydrophobe Wechselwirkung unpolarer Gruppen mit angrenzenden Bereichen der Wasserstruktur zurückgeführt werden^[93, 94].

8.2. Mehrkomponentensysteme, Lipid-Protein-Wechselwirkung und Mischungs- oder Titrationskalorimetrie

Bei der formalen Beschreibung des Mischungsverhaltens von Lipid-Mehrkomponentensystemen können die Methoden der klassischen Mischphasenthermodynamik weitgehend unverändert angewendet werden^[97]. Die Mischungsdiagramme lassen sich aus den bei mehreren Mischungsverhältnissen aufgenommenen DSC-Meßkurven ableiten^[9]. Im Zusammenhang mit der Lipid-Protein-Wechselwirkung interessiert insbesondere die Frage nach dem Ordnungszustand der Lipidmoleküle in der unmittelbaren Umgebung (Annulus-Zone) integraler Membranproteine^[98]. Abbildung 9 zeigt als Beispiel einen Satz von DSC-Meßkurven wässriger Suspensionen von Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC)-Bacteriorhodopsin-Vesikeln^[99, 100] für verschiedene Werte der Mischungsverhältnisse DMPC/Bacteriorhodopsin. Aus dem Vergleich der auf der Basis eines einfachen Modells simulierten Umwandlungskurven mit den experimentell ermittelten Umwandlungskurven läßt sich entnehmen, daß der Ordnungszustand von etwa sechzig DMPC-Molekülen durch ein eingelagertes Bacteriorhodopsinmolekül unter Verminderung des individuellen ΔH_2 -Wertes dieser

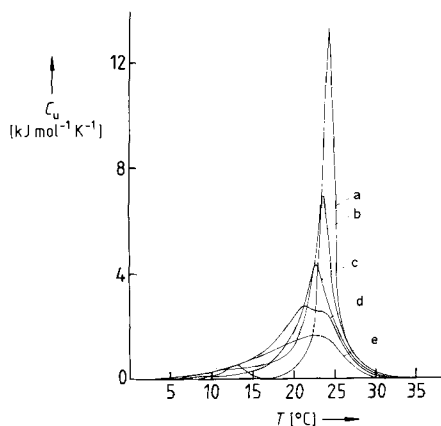
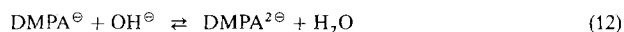


Abb. 9. DSC-Meßkurven von DMPC-Bacteriorhodopsin-Mischvesikel-Suspensionen mit den Mischungsverhältnissen a) ∞ , b) 552, c) 316, d) 188, e) 91 (nach [99]).

Moleküle (um ca. 30 %) beeinflusst wird. Demnach ist dem eingelagerten Protein ein über die unmittelbar angrenzende Lipidzone hinaus wirksamer „Ordnungseffekt“ zuzuschreiben. Ähnliche Befunde ergaben sich auch bei Messungen, die im Reaktions- oder Mischungskalorimeter zur Charakterisierung des Phospholipid-Melittin-Systems^[9] durchgeführt wurden.

Als Beispiel für Messungen mit einem Mischungskalorimeter^[32] sei hier die Untersuchung der Reaktion



genannt^[9]. Die Reaktionsenthalpie ΔH_{diss} der DMPA[−]-Deprotonierung erhält man durch Abzug der dem Umsatz entsprechenden Neutralisationsenthalpie von der gemessenen Gesamtreaktionsenthalpie, wenn die Verdünnungsenthalpie des NaOH durch Kompensation in einer Zwillingskalorimeteranordnung eliminiert worden ist. Die graphische Darstellung des Temperaturverlaufes der ΔH_{diss} -Werte (Abb. 10) läßt drei charakteristische Temperaturbereiche

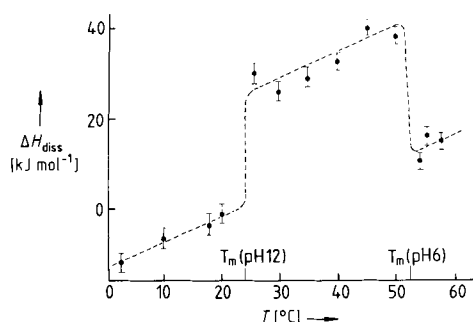


Abb. 10. Temperaturverlauf der Dissoziationsenthalpie ΔH_{diss} für die zweite Dissoziationsstufe von Dimyristoylphosphatidsäure [9].

erkennen. Im Temperaturbereich unterhalb 22 °C tritt zusätzlich zur Deprotonierung ein Wechsel des Neigungswinkels der Fettsäureketten (Phasenübergang $L_{\beta} \rightarrow L_{\beta'}$) auf; zwischen 22 °C und 51 °C überlagert sich der Deprotonierung die $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ -Phasenumwandlung^[9]; oberhalb 51 °C geben die experimentell bestimmten ΔH_{diss} -Werte den wahren Wert der Deprotonierungsenthalpie annähernd richtig wieder, da sich in diesem Temperaturbereich der Phasenzustand des Lipids nicht ändert. Eine detaillierte Diskussion der Ergebnisse findet sich im zitierten Aufsatz^[9].

9. Übersichtstabelle

Mit einer Übersichtstabelle (Tabelle 2) soll abschließend die Möglichkeit zum Größenvergleich der ΔH -Werte verschiedener wichtiger Prozesse gegeben werden. Tabelle 2

Tabelle 2. Größenordnung charakteristischer ΔH -Werte für verschiedene Typen von Strukturumwandlungen in Biopolymerlösungen und wäßrigen Lipidsuspensionen.

Modellsubstanz	Prozeß	molekulare Untereinheit	ΔH [kJ mol ^{−1}]	Lit.
spezifische Transfer-Ribonucleinsäure	Denaturierung der Sekundärstruktur	tRNA-Molekül	1180	[44, 46]
Desoxyribonucleinsäure	Doppelhelix-Knäuel-Umwandlung	Basenpaar	35	[38, 39]
Polyriboadenylsäure	Basen-Entstapelung	Nucleotidrest	15	[10]
DNA und Ethidiumbromid (EB)	Aufhebung der „Intercalation“	EB-Molekül	20	[31]
Viroid	Denaturierung und Sekundärstruktur	CPFV-Molekül	3900	[50]
Poly(γ -benzyl-L-glutamat) in Dichloressigsäure/1,2-Dichlorethan	α -Helixbildung	Aminosäurerest	4	[22]
(Pro,Pro,Gly) ₁₅	Polyprolin-II-Helix-Knäuel-Umwandlung	Aminosäurerest	2	[10]
Poly(N ⁵ -3-hydroxypropyl-L-glutamin)	α -Helix-Knäuel-Umwandlung	Kettensegment	0.5	[10]
Protein	Denaturierung	α -Untereinheit der Tryptophan-Synthase Mutante-Ser 49 ($M_r = 29000$ g mol ^{−1})	100	[10, 65, 70]
Phospholipid-Vesikel in wäßriger Suspension	Lipid-Phasenumwandlung Gel \rightleftharpoons flüssig-kristallin	DPPC-Molekül	42	[83]
Phosphatidsäure	Deprotonierung (2. Stufe)	DMPA-Molekül oder -Ion	10	[9]

zeigt auch die Breite der Anwendungsmöglichkeiten kalorimetrischer Meßmethoden zur thermodynamischen Charakterisierung von Biopolymeren und suspendierten Lipiden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die Unterstützung unserer wissenschaftlichen Arbeit. Mein besonderer Dank gilt gleichermaßen den im Literaturverzeichnis genannten früheren und den jetzt im Arbeitskreis tätigen Mitarbeitern für ihren unermüdlichen Einsatz und für zahlreiche fruchtbare Diskussionsbeiträge.

Eingegangen am 16. Juni 1987,
veränderte Fassung am 15. November 1988 [A 727]

- [1] J. Engel, G. Schwarz, *Angew. Chem.* 82 (1970) 468; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 9 (1970) 389.
- [2] B. H. Zimm, J. K. Bragg, *J. Chem. Phys.* 31 (1959) 526.
- [3] J. Applequist, *J. Chem. Phys.* 38 (1963) 934.
- [4] B. H. Zimm, P. Doty, K. Iso, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45 (1959) 1601.
- [5] J. Marmur, P. Doty, *J. Mol. Biol.* 5 (1962) 109.
- [6] D. Chapman, R. M. Williams, B. D. Ladbroke, *Chem. Phys. Lipids* 1 (1967) 445.
- [7] J. A. Lucy in D. Chapman (Hrsg.): *Biological Membranes*, Academic Press, London 1968, S. 261ff.
- [8] D. Bach in D. Chapman (Hrsg.): *Biomembrane Structure and Function*, Verlag Chemie, Weinheim 1984, S. 1ff.
- [9] A. Blume in C. Hidalgo (Hrsg.): *Physical Properties of Membranes, Functional Implications*, Plenum Press, New York 1988, S. 71.
- [10] H.-J. Hinz (Hrsg.): *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology*, Springer, Berlin 1986.
- [11] G. C. Pimentel, A. L. McClellan: *The Hydrogen Bond*, Freeman, New York 1960.
- [12] S. Lifson, A. Roig, *J. Chem. Phys.* 34 (1961) 1963.
- [13] N. Davidson: *Statistical Mechanics*, McGraw-Hill, New York 1962, S. 385ff.
- [14] R. Jaenicke, *Angew. Chem.* 96 (1984) 385; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 395.
- [15] J. Marmur, D. Lane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46 (1960) 453.
- [16] E. Neumann, *Angew. Chem.* 85 (1973) 430; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 12 (1973) 356.
- [17] D. Barszcz, D. Shugar, *Eur. J. Biochem.* 5 (1968) 91.
- [18] H. Träuble, H. Eibl in F. O. Schmitt, D. M. Schneider, D. M. Crothers (Hrsg.): *Functional Linkage in Biomolecular Systems*, Raven Press, New York 1975, S. 59ff.
- [19] G. Messner, M. Grubert, *J. Phys. E* 16 (1983) 131.
- [20] T. Ackermann, H. Rüterjans, *Z. Phys. Chem. (Frankfurt/Main)* 41 (1964) 116.
- [21] E. Neumann, T. Ackermann, *J. Phys. Chem.* 73 (1969) 2170.
- [22] T. Ackermann, H. Rüterjans, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 68 (1964) 850.
- [23] T. Ackermann, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 62 (1958) 411.
- [24] M. Grubert, T. Ackermann, *Z. Phys. Chem. (Frankfurt/Main)* 93 (1974) 255.
- [25] T. Ackermann in D. B. Davies, W. Saenger, S. S. Danyluk (Hrsg.): *Structural Molecular Biology*, Plenum, New York 1982, S. 305ff.
- [26] W. Hemminger, G. Höhne: *Calorimetry*, Verlag Chemie, Weinheim 1984.
- [27] P. L. Privalov, V. V. Plotnikov, V. V. Filimonov, *J. Chem. Thermodyn.* 7 (1975) 41.
- [28] K. S. Krishnan, J. F. Brandts, *Methods Enzymol.* 49 (1978) 1.
- [29] M. Grubert, *Z. Phys. Chem. (Frankfurt/Main)* 93 (1974) 255.
- [30] C. L. Stevens, G. Felsenfeld, *Biopolymers* 2 (1964) 293.
- [31] W. Burkart, H. Klump, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 85 (1981) 371.
- [32] I. Wadsö, *Acta Chem. Scand.* 22 (1968) 927.
- [33] W. Burkart, H. Klump, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 85 (1981) 375.
- [34] H. Klump, T. Ackermann, *Biopolymers* 10 (1971) 513.
- [35] P. L. Privalov, D. R. Monaselidze, *Zh. Eksp. Teor. Fiz.* 47 (1964) 2073.
- [36] L. G. Bunville, P. E. Geiduschek, M. A. Rawitscher, J. M. Sturtevant, *Biopolymers* 3 (1965) 213.
- [37] J. M. Sturtevant, S. Rice, P. E. Geiduschek, *Discuss. Faraday Soc.* 25 (1958) 138.
- [38] H. Klump, *Thermochim. Acta* 85 (1985) 457.
- [39] H. Klump, K. Herzog, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 88 (1984) 20.
- [40] G. N. Lewis, M. Randall: *Thermodynamics*, 2. Aufl. (überarbeitet von K. S. Pitzer, L. Brewer), McGraw-Hill, New York 1961, S. 246ff.
- [41] T. Ackermann in H. D. Brown (Hrsg.): *Biochemical Microcalorimetry*, Academic Press, New York 1969, S. 128ff.
- [42] H. Klump, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 91 (1987) 206.
- [43] U. Schernau, T. Ackermann, *Biopolymers* 16 (1977) 1735.
- [44] D. Bode, U. Schernau, T. Ackermann, *Biophys. Chem.* 1 (1974) 214.
- [45] H. J. Hinz, V. V. Filimonov, P. L. Privalov, *Eur. J. Biochem.* 72 (1977) 79.
- [46] F. J. Schott, M. Grubert, W. Wangler, T. Ackermann, *Biophysical Chemistry* 14 (1981) 25.
- [47] D. Riesner, H. J. Gross, *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985) 531.
- [48] D. Riesner, G. Steger, J. Schumacher, H. J. Gross, J. W. Randles, H. L. Sängler, *Biophys. Struct. Mech.* 9 (1983) 143.
- [49] J. Langowski, H. Henco, D. Riesner, H. L. Sängler, *Nucleic Acids Res.* 5 (1978) 1589.
- [50] H. Klump, D. Riesner, H. L. Sängler, *Nucleic Acids Res.* 5 (1978) 1581.
- [51] E. Neumann, T. Ackermann, *J. Phys. Chem.* 71 (1967) 2377.
- [52] H. Krakauer, J. M. Sturtevant, *Biopolymers* 6 (1968) 491.
- [53] H.-J. Hinz, W. Haar, T. Ackermann, *Biopolymers* 9 (1970) 923.
- [54] D. W. Gruenwedel, *Biochim. Biophys. Acta* 395 (1975) 246.
- [55] F. H. C. Crick, *J. Mol. Biol.* 19 (1966) 548.
- [56] J. Stulz, T. Ackermann, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 87 (1983) 447.
- [57] D. Söll, *J. Mol. Biol.* 29 (1967) 113.
- [58] K. J. Breslauer in H.-J. Hinz (Hrsg.): *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology*, Springer, Berlin 1986, S. 402.
- [59] S. M. Freier, M. Petersheim, D. R. Hickey, D. H. Turner, *J. Biomol. Struct. Dynam.* 1 (1983) 1229.
- [60] D. Albergo, L. A. Marky, K. J. Breslauer, D. H. Turner, *Biochemistry* 20 (1981) 1409.
- [61] K. J. Breslauer, J. M. Sturtevant, I. Tinoco Jr., *J. Mol. Biol.* 99 (1975) 549.
- [62] A. R. Peacocke in R. M. Acheson (Hrsg.): *Acridines*, 2. Aufl., Wiley, New York 1973, S. 723ff.
- [63] M. J. Waring in E. F. Gale, E. Cundliffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond, M. J. Waring (Hrsg.): *The Molecular Basis of Antibiotic Action*, 2. Aufl., Wiley, New York 1981, S. 273ff.
- [64] H. W. Zimmermann, *Angew. Chem.* 98 (1986) 115; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 115.
- [65] W. Pfeil in H.-J. Hinz (Hrsg.): *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology*, Springer, Berlin 1986, S. 349.
- [66] F. E. Karasz, J. M. O'Reilly, H. E. Bair, *Nature (London)* 202 (1964) 693.
- [67] T. Ackermann, E. Neumann, *Biopolymers* 5 (1967) 649.
- [68] V. Ganser, J. Engel, D. Winklmair, G. Krause, *Biopolymers* 9 (1970) 329.
- [69] R. Jaenicke, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 10 (1981) 1.
- [70] W. Pfeil, P. L. Privalov in M. N. Jones (Hrsg.): *Biochemical Thermodynamics (Studies in Modern Thermodynamics, Vol. 1)*, Elsevier, Amsterdam 1979, S. 75ff.
- [71] P. D. Ross in H.-J. Hinz (Hrsg.): *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology*, Springer, Berlin 1986, S. 227.
- [72] J. M. Sturtevant, G. Veliceleby, R. Jaenicke, M. A. Lauffer, *Biochemistry* 20 (1981) 3792.
- [73] H. Wiesinger, H.-J. Hinz in H.-J. Hinz (Hrsg.): *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology*, Springer, Berlin 1986, S. 211.
- [74] M. I. Paz Andrade, M. N. Jones, H. A. Skinner, *Eur. J. Biochem.* 66 (1976) 127.
- [75] J. F. Halsey, R. L. Biltonen, *Biochemistry* 14 (1975) 6221.
- [76] M. F. M. Johnston, B. G. Barisas, J. M. Sturtevant, *Biochemistry* 13 (1974) 390.
- [77] T. Kodama, I. D. Watson, R. C. Woledge, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 8085.
- [78] T. Kodama, R. C. Woledge, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 6382.
- [79] C. W. Niekamp, H.-J. Hinz, R. Jaenicke, C. Woenckhaus, R. Jeck, *Biochemistry* 19 (1980) 3144.
- [80] R. P. Hearn, F. M. Richards, J. M. Sturtevant, G. D. Watt, *Biochemistry* 10 (1971) 806.
- [81] H.-J. Hinz, S. Srinivasan, E. M. J. Jaspars, *Eur. J. Biochem.* 95 (1979) 107.
- [82] E. Jürgens, G. Höhne, E. Sackmann, *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* 87 (1983) 95.
- [83] A. Blume, T. Ackermann, *FEBS Lett.* 43 (1974) 71.
- [84] A. Blume, *Biochemistry* 22 (1983) 5436.
- [85] R. J. Wittebort, C. F. Schmidt, R. G. Griffin, *Biochemistry* 20 (1981) 4223.
- [86] H.-J. Hinz, L. Six, K.-P. Ruess, M. Liefländer, *Biochemistry* 24 (1985) 806.
- [87] J. Stümpel, H. Eibl, A. Niksch, *Biochem. Biophys. Acta* 727 (1983) 246.
- [88] G. Wedler: *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim 1982, S. 237.
- [89] G. Kortüm, H. Lachmann: *Einführung in die chemische Thermodynamik*, Verlag Chemie, Weinheim 1981, S. 124.
- [90] Siehe [40], S. 375ff.
- [91] P. Privalov, N. N. Khechinashvili, *J. Mol. Biol.* 86 (1974) 556.
- [92] E. Wicke, *Angew. Chem.* 78 (1966) 1; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 5 (1966) 106.
- [93] G. C. Kresheck in F. Franks (Hrsg.): *Water, A Comprehensive Treatise, Vol. 4*, Plenum Press, New York 1975, S. 95ff.
- [94] F. M. Menger, *Acc. Chem. Res.* 12 (1979) 111.
- [95] N. Nichols, R. Sköld, C. Spink, J. Suurkuusk, I. Wadsö, *J. Chem. Thermodyn.* 8 (1976) 1081.
- [96] G. Roux, G. Perron, J. E. Desnoyers, *Can. J. Chem.* 56 (1978) 2808.
- [97] A. G. Lee, *Biochem. Biophys. Acta* 472 (1977) 285.
- [98] N. J. Singer, G. L. Nicholson, *Science (Washington, DC)* 175 (1972) 720.
- [99] M. P. Heyn, A. Blume, M. Rehorek, N. A. Dencher, *Biochemistry* 20 (1981) 7109.
- [100] M. P. Heyn, R. J. Cherry, N. A. Dencher, *Biochemistry* 20 (1981) 840.