

DNA Denaturierung

Seminarvortrag WiSe 13/14

Soft Matter und Biophysik: Experiment und Theorie

Sabrina Pospich

Fakultät für Physik
Technische Universität Dortmund

6. Februar 2013

- 1 **Einleitung - Ein wenig Biologie**
 - Was ist Denaturierung?
 - Struktur der DNA
- 2 **Die Fragen der Denaturierung**
 - Schmelzkurven - Denaturierung durchleuchtet
 - Motivation
 - Fortschritt im Laufe der Zeit
- 3 **Die Theorie der Denaturierung**
 - Grundlagen
 - Basenpaar-Modell
 - Stacking-Modell
 - Das Parameterproblem
 - Vergleich Theorie & Experiment
- 4 **Phasenübergang?!**
 - Grundlagen
 - Das Necklace - Modell



Denaturierung

- Aufbruch von Bindungen
- Strukturelle Veränderung des Biomoleküls ab der Sekundärstruktur
- Veränderung/ Verlust der Funktion und spezifischer Eigenschaften
- Mögliche Ursachen: Temperaturerhöhung, Änderung des pH-Werts oder der Salzkonzentration, Strahlenschäden, Chemikalien



[EI14]

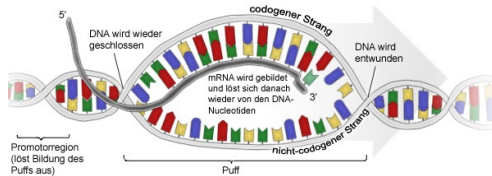


[TH14]

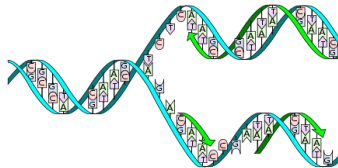


[QU14]

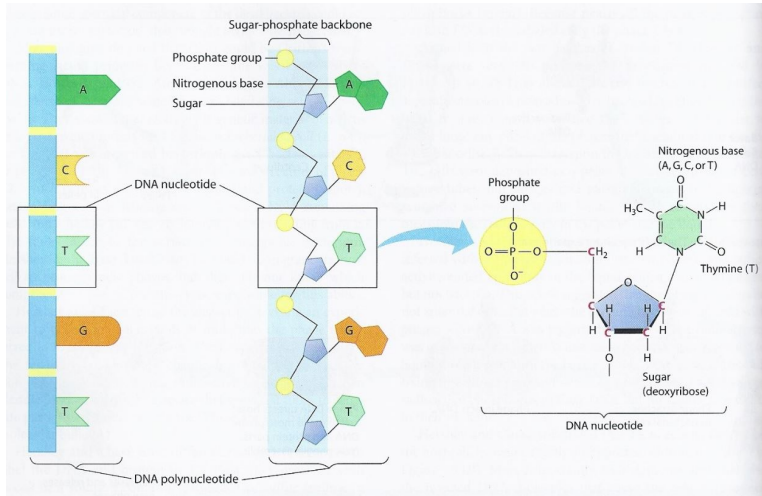
Denaturierung ist ein notwendiger Bestandteil lebenserhaltender Prozesse.
Verwendung für Bio-Chemische-Technologien, wie PCR.



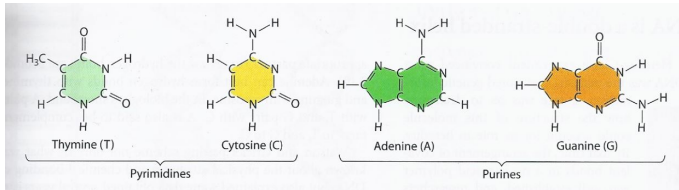
[TK14] Transkription



[RK14] Replikation



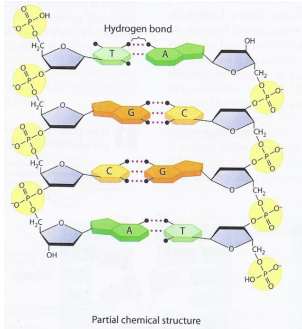
[BIO09]



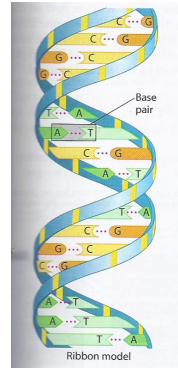
[BIO09] Stickstoffbasen

Die drei Bestandteile des Nukleotids geben sowohl die Funktion der DNA, wie auch die Struktur der Doppelhelix vor.

Ohne die Elemente P, O, N, C und H ist kein Leben möglich.



[BIO09]



[BIO09]

Entscheidend für die Struktur der Doppelhelix sind Wasserstoffbrücken und Stapelwechselwirkungen benachbarter BP.

Phosphatrückgrat: hydrophil & Basen: hydrophob

⇒ Um das Wasser aus dem Zwischenraum zu verdrängen, „stapeln“ sich die Basen dicht auf einander.

- Es handelt sich um eine ungerichtete WW
- Verringerung der Kontaktfläche zwischen Wasser und lipophiler Schicht
⇒ Entropiegewinn
- Chemisch durch eine WW der π -Elektronensysteme der beiden Basen zu verstehen.
- Typische Eigenschaften von planaren, (quasi-)aromatischen Strukturen.
- Stapel-WW ist sequenzabhängig, am schwächsten ist AT-AT und GC-GC am stärksten (TD stabiler)

Bei der Denaturierung werden zuerst die dominierenden Stapel-WW überwunden, anschließend die schwächeren H-Brücken aufgebrochen.



Ein Durchbruch für die Strukturaufklärung

- 1953 veröffentlichten Watson und Crick einen kurzen Artikel über die rechtshändige, helikale Struktur der DNA
- 1962 erhielten Watson, Crick & Wilkins für ihr räumliches Modell der DNA den Nobelpreis für Medizin

- Theorien wurden aus Röntgenaufnahmen abgeleitet.
- Vor der Veröffentlichung wurden Verwicklungen von 3 Strängen postuliert.

Watson & Crick erkannten unter anderem, dass

- nur A–T und G–C binden.
- eine Desoxyribose vorhanden sein muss.
- H-Brücken die entscheidende WW sind.

Schmelztemperatur T_m

Temperatur bei der die Hälfte der DNA denaturiert ist.

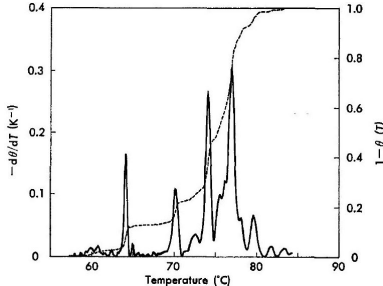
- Abhängig von der DNA-Sequenz
- Liegt zwischen 50-100 °C

Experimentell aus Schmelzkurven bestimmbar.

Schmelzkurve

Relative Absorption θ bei meist 260 nm als Funktion der Temperatur.

- Kummulatives Schmelzprofil : $1 - \theta(T)$
- Differentielles Schmelzprofil : $-\frac{d\theta}{dT}$



[GOT83]

- Schmelzkurven zeigen reproduzierbare Feinstruktur
- Schmelzregionen \approx kBP denaturieren in Intervallen von 0,3-0,5 °C
- Schärfere Struktur für kurze DNA

- Feinstruktur durch Schmelzen kooperativer Schmelzregionen (Loops)
- Öffnung eines Loops beeinflusst die Stabilität benachbarter Loops
- Minimale Fluktuationen der BP verändern die Feinstruktur signifikant

Die Öffnung von kooperativen Loops kann mittels Elektronenmikroskopie verfolgt werden.

- Prozess der enzymatischen Denaturierung noch nicht verstanden
- Verständnis thermischer Denaturierung wäre ein erster Schritt

Spielen fluktuierende
loops bei biologischen
Prozessen eine Rolle?

Warum treten
loops auf?

Wovon hängt die
Stabilität der
einzelnen Bereiche
ab?

Können kooperative Bereiche anhand der
BP-Sequenz vorher gesagt werden?

Warum ist die
Feinstruktur für kurze
DNA schärfer?

Wie wichtig ist die WW
der kooperativen
Bereiche?

- 1953 Veröffentlichung Watson & Crick zur DNA Doppelhelix
- 1960er Beobachtung erster Schmelzkurven mit Feinstruktur
- 1970er Goldene Ära der Schmelzstudien
- 1970 Erste DNA-Sequenzierungs Methoden
- 1977 Poland-Fixmann-Freire Algorithmus
- 1990er Computertechnik und das WorldWideWeb
- 1990er DNA Sequenzierung: schneller und günstiger
- 2000 Bestimmung der Ordnung des Phasenübergangs
- 2004 Erste Entschlüsselung des menschlichen Genoms

Die meisten Modelle bauen auf einem Basismodell ähnlich dem Isingmodell von B. H. Zimm auf (1960).

Verwendete Annahmen

- DNA als 1D Gitter aus N BP
- H-Brücken zwischen komplementären Basen
- Hydrophobe/ Stapelwechselwirkung zwischen nächsten Nachbarn
- Zwei Zustände für BP: gebunden / ungebunden

Base pair model

Site No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Configuration vector	0	0	1	1	1	0	0	1	1
Scheme										
Statistical weight	1		s_3	s_4	s_5		σ_2		s_8	s_9
Segment	E		H			I			H	

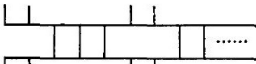
[GOT83]

Zustandsumme Z_c ist das Produkt der Stapilitätsparameter s_k und Loop-Gewichtungsfaktoren σ_l . Faktoren werden nach folgenden Regeln verwendet.

- Gebundenes k-tes BP $\Rightarrow s_k$
- Innerer Loop mit l ungebundenen BP $\Rightarrow \sigma_l$
- Gewichtung 1 für die Enden der Kette (keine freie Energie).

Die dominante, strukturgebende WW der DNA ist die Stacking-WW
 ⇒ anpassen des Modells.

Stacking model

Site No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Configuration vector	0	0	1	1	0	0	0	1
Scheme									
Statistical weight	1	s_3	s_4	σ_3	s_8				
Segment	E	H		I				H	

[GOT83]

- Jedem BP Doublet wird ein Stabilitätsparameter zugewiesen
- Beschreibung durch einen N-1-Dimensionalen Vektor \vec{c}
- WW zwischen Doublet \triangleq stacked
- stacked 1 / unstacked 0

Regeln der Zustandssumme können übernommen werden, mit

- $l = \# \text{ unstacked Doublets} = \# \text{ offene BP} + 1$
- $k = \text{Doublet aus } k\text{-tem und } (k+1)\text{sten BP}$

Stabilitätsparameter des Basenpaars MN

$$s_k = s_{MN} = \exp \left(- \frac{\Delta H_{MN} - T \Delta S_{MN}}{RT} \right)$$

- Die Entropie ΔS_{MN} und Enthalpie ΔH_{MN} werden als konstant angenommen
- Kalorische Messungen zeigten $\Delta S_{MN} \approx \Delta S \approx \text{const}$
- Relevanter Parameter ist die Schmelztemperatur $T_{MN} = \frac{\Delta H_{MN}}{\Delta S}$

Vereinfachende Annahme $T_{MN} = T_{NM}$, und $T_{MN} = (T_M + T_N)/2$
 \Rightarrow Zwei unabhängige Parameter, da $T_A = T_T$ und $T_G = T_C$

Bestimmung von T_A und T_G aus Modell DNA mit 100% AT / GC BP.

Loop gewichtende Faktoren

- müssen von der Loop-Entropie abhängen
- sollten für innere Loops < 1 sein (weniger Freiheitsgrade)
- Fallende Funktion, aber langsamer als $\exp(-l)$
- müssen mit der Ionenstärke abnehmen
- müssen mit der experimentell beobachteten Steifheit der Helix einhergehen

⇒ Kein Beweis für die genaue funktionale Form von σ_l
Meinungen gehen stark auseinander!

$$\sigma_l = \sigma_0 \lambda_l \epsilon_l ? \quad \sigma_l = \sigma_0 \Psi_l \cdot \frac{l \cdot c_l}{c_\infty} ? \quad \sigma_l = \sigma_0 l^{-c} ? \quad \sigma_l = \sigma_0 (l - d)^{-c} ?$$

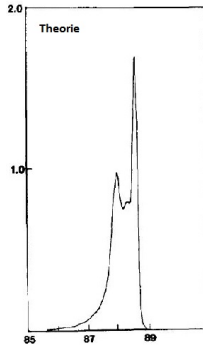
Bereits bei diesem einfachen Modell mussten **sehr viele Annahmen** gemacht werden.

Bei komplexeren Betrachtungen, welche beispielsweise

- Die Zustandssumme in eine Interne und Externe aufspalten.
- Die Abhängigkeit von Molekülmasse und Form berücksichtigen.
- Heterogenitäten der Sequenz berücksichtigen.
- Änderung von Translations- und Rotationsfreiheitsgraden betrachten.
- Die Loop-Entropie als zusätzlichen Parameter einführen.

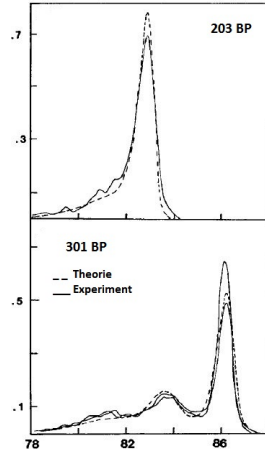
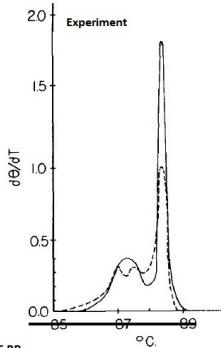
werden die Meinungsverschiedenheiten und Unsicherheiten der Theorien nur größer.

Unterscheidung zwischen langer >1000 BP und kurzer <600 BP DNA ist nötig.



1695 BP

[WAR85]



[WAR85]

Woran liegen die Abweichungen??

Mögliche Ursache: Theorien berechnen Gleichgewichtsschmelzkurven

Hysterese- Effekt

Teilweise denaturierte DNA zeigt Irreversibilitäten in ihren Schmelzkurven, wenn mit der gleichen Rate gekühlt wird, wie zuvor geheizt.

Gewöhnlich wird mit $v = 0,1 - 0,2^{\circ}\text{C} / \text{min}$ geheizt.

Für Gleichgewichtsschmelzkurven muss gelten

$$t_{\text{rel}} < t_{\text{exp}} = \frac{\Delta T_m}{v}$$

Bsp. 100-300 BP, $\Delta T_m \approx 0,3^{\circ}\text{C}$ und $v = 0,002^{\circ}\text{C} / \text{min} \Rightarrow t_{\text{rel}} < 150\text{s}$

Biomoleküle können sehr langsam sein.

1D statistisch-mechanische Systeme mit kurzreichweitigen WW zeigen keinerlei Phasenübergänge für $T > 0$

- Bei beinahe 1D Systemen und
- Systemen mit langreichweitiger WW

können jedoch Phasenübergänge beobachtet werden.

⇒ Ursache und Ordnung des Phasenübergangs der DNA?

Vorgehen

- Ableiten der Zustandssumme aus der freien Energie
- Bedeutung der Singularität der großkanonischen Zustandssumme
- Ansatz für das Necklace - Modell und dessen Bedeutung
- Schlussfolgerung der Ordnung des Übergangs

Freie Energie pro Längeneinheit $f(T)$

$$f(T) = - \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{n} \ln(Z_n(T))$$

$$\Rightarrow Z_n(T) = \exp(-f(T)n)$$

Für die großkanonische Zustandssumme gilt

$$G(z, T) = \sum_{n=0}^{\infty} z^n Z_n(T)$$

mit der Fugazität $z = \exp(\beta\mu)$.

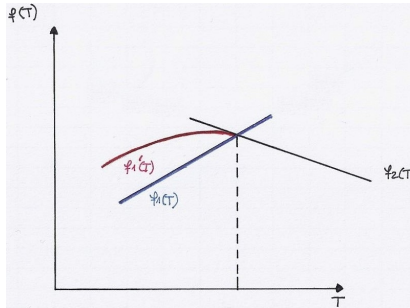
Die Reihe konvergiert für $z^n Z_n(T) < 1 \Rightarrow$ Kleinste Singularität bei $z_0^n Z_n(T) = 1$

$$z_0 = \exp(f(T))$$

$$f(T) = \ln(z_0)$$

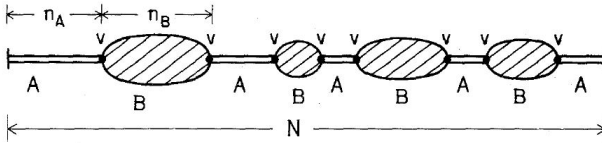
Gibt es mehrere Singularitäten kann es zum Phasenübergang kommen.
Singularitäten sind Funktionen z.B. $z_0(T)$. Der Zweig der freien Energie kann
gewechselt werden, da das System eine minimal freie Energie bevorzugt.

⇒ Punkt des Phasenübergangs



$f_1(T)$ Phasenübergang 1. Ordnung

$f_1'(T)$ Kontinuierlicher Phasenübergang



[FIS84]

Mit den kanonischen Zustandssummen Q_n ergibt sich

$$G_A(z) = \sum_n Q_n^A z^n \qquad G_B(z) = \sum_n Q_n^B z^n$$

Unter der Annahme, dass die Ränder immer geschlossen sind gilt

$$G(z) = G_A + G_A \nu G_B \nu G_A + G_A \nu G_B \nu G_A \nu G_B \nu G_A + \dots$$

mit ν als Gewichtungsfaktoren der Vertices

Wenn nun z hinreichend klein ist, konvergiert die Reihe zu

$$G(z) = \frac{G_A(z)}{1 - \nu^2 G_A(z) G_B(z)}$$

Außer bei den Singularitäten von

- $G_A(z)$ und $G_B(z)$
- $\nu^2 G_B(z) = \frac{1}{G_A(z)}$

Die Ordnung des Phasenübergangs erhält man durch einen konkreten Ansatz für Q_A und Q_B .

Geschlossener Zustand: fester Energiebetrag pro Bindung, kein Entropiebeitrag

$$Q_A^n = u^n \quad u = \exp(-\beta\epsilon)$$

Offener Zustand: Keine Bindungsenergie, rein entropischer Beitrag

$$Q_B^n = \frac{q_0 w^n}{n^\psi} \quad w = \exp(-\sigma_o(T))$$

- Vergleich des Ansatzes mit dem BP-Modell:
Die Faktoren u und w spiegeln den Stabilitätsparameter s_k wider.
Das Necklace-Modell berücksichtigt keine Sequenzabhängigkeit $\Rightarrow s_k = C$.
 $\sigma_l = \sigma_0 l^{-c} \hat{=} q_0 n^{-\psi}$ beschreibt die Loop-Entropie.
- Ψ ermöglicht die Anpassung der Möglichkeiten an gegebene Bedingungen
Loop: Random-Walk mit Rückkehr und Selbstvermeidung.

$$G_B(z) = \sum_n \frac{q_o(wz)^n}{n^\Psi}$$

Das Konvergenzverhalten bei $wz \rightarrow 1$ hängt von Ψ ab.

Untersuchung: Schnittpunkt der Singularitäten von $G(z)$ bei $wz \rightarrow 1$

Zusammenfassung der Ergebnisse

- $\Psi \leq 1$ $G_B(z)$ und $G(z)$ divergieren
- $1 < \Psi < 2$ Kontinuierlicher Phasenübergang
- $\Psi > 2$ Phasenübergang 1. Ordnung

Für einen Random-Walk in 3D, welcher zurückkehrt, ergibt sich $\Psi = 1,5$. Jedoch steigt Ψ unter Berücksichtigung von

- Selbstvermeidung des Loops
- Vermeidung benachbarter Loops
- Sequenzabhängigkeit der Stabilität
- Stem-Bildung

Für DNA ergibt sich ein Phasenübergang 1. Ordnung

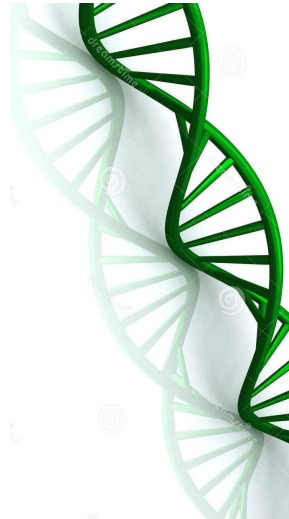
Der Faktor $n^{-\Psi}$ kann als langreichweitige WW verstanden werden.

- Dies erklärt die Existenz eines Phasenübergangs dieses „1D“ Systems
- Zeigt die Grenzen eines Ising-artigen Modells

- Überblick DNA Aufbau
- Bedeutung der Denaturierung
- Experiment: Schmelzkurven und Temperaturen
- Einfache Modelle: BP- und Stacking-Modell
- Probleme und Grenzen der Modelle
- Ordnung des Phasenübergangs



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!





[BIO09] CAMPBELL, REECE, TAYLOR, SIMON, SICKEY, '*Biology - Concepts & Connections*', Pearson International Edition, 6. Auflage (2009)



[WC53] WATSON, J.D. & CRICK F.H., '*Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid.*', In: Nature. Bd. 171, Nr. 4356, S. 737–738e (1953)



[GOT83] OSAMU GOTOH, '*Prediction of melting profiles and local helix stability for sequenced DNA*', Adv. Biophys. Vol. 16, pp. 1-52 (1983)



[WAR85] ROGER M. WARTELL, ALBERT S. BENIGHT, '*Thermal denaturation of DNA molecules: A comparison of theory with experiment*', Physics Reports 126, No.2 67-107, Amsterdam (1985)



[PEY89] M. PEYRARD, A.R. BISHOP, '*Statistical mechanics of a nonlinear model for DNA denaturation*', Physical review letters, Vol. 62, No. 23 (1989)



[FIS84] MICHEAL E. FISHER, '*Walks, Walls, Wetting and Melting*', Journal of Statistical Physics, Vol. 34 Nos. 5/6 (1984)



[KAF00] YARIV KAFRI, DAVID MUKAMEL, LUCA PELITI, '*Why is the DNA denaturation transition first order*', Physical review letters, Vol. 85, No. 23 (2000)



[NAT14] http://news.nationalgeographic.com/news/2004/05/0521_040521_extremeheat_2.html, 25.1.2014



[BIO09] CAMPBELL, REECE, TAYLOR, SIMON, SICKEY, '*Biology - Concepts & Connections*', Pearson International Edition, 6. Auflage (2009)



[EI14] http://muenchenglueck.de/images/spiegelei_kochen.jpg, 25.1.2014



[QU14] http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f5/Grand_prismatic_spring.jpg/275px-Grand_prismatic_spring.jpg, 25.1.2014



[TH14] <http://www.tk.de/centaurus/servlet/contentblob/534640/Bild/105590>, 25.1.2014



[ST14] <http://www.evi.com/images/thumbs/180/250/b97321e0511f7de1a7e70a568885f2f4>, 25.1.2014



[AK14] http://www.praxisdienst.com/out/pictures/wysiwigpro/129770_129771_zoom1_z1.jpg, 25.1.2014



[TK14] <http://www.lukashensel.de/transk.jpg>, 25.1.2014



[RK14] http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/33/DNA_replication_split_horizontal.svg/440px-DNA_replication_split_horizontal.svg.png, 25.1.2014

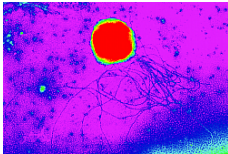


[PCR14] <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4a/Polymerasekettenreaktion.svg/840px-Polymerasekettenreaktion.svg.png>, 25.1.2014



[TI14] <http://thumbs.dreamstime.com/z/3d-abstract-green-dna-spiral-reflection-25479713.jpg>, 2.2.2014

- Faszinierender Mikroorganismus der Gattung Archae
- Lebt 320 km tief im Pazifik
- Gehört den Hyperthermophilen an
- Hält den Weltrekord der Hitzebeständigkeit, lebt bei 121 ° C
- Theoretisch müsste die gesamte DNA denaturieren
- Brachte bis dahin verwendete Sterilisationsverfahren an ihre Grenzen

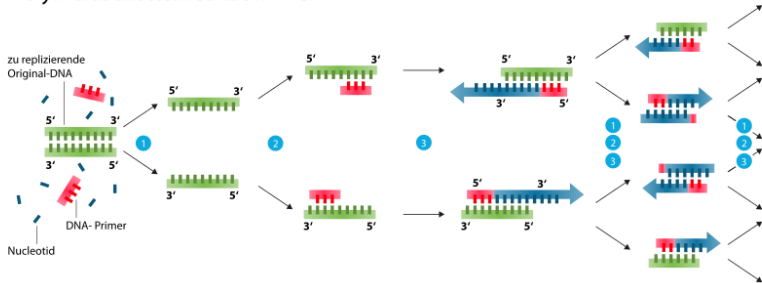


[ST14]



[AK14]

Polymerasekettenreaktion - PCR



- 1 **Denaturierung** (Schmelzen) bei ca. 96°C
- 2 **Primerhybridisierung** (Anlagerung) bei ca. 68°C
- 3 **Elongation** (Verlängerung) bei ca. 72 °C

[PCR14]

- Zur Vervielfältigung von DNA und RNA für z.B. DNA Sequenzierung
- Durch hohe Temperaturen wird wirtseigene Polymerase meist zerstört
- Verwendung der Taq-Polymerase um die Nukleotide zu verbinden

Taxonomie

Klassifikation von Lebewesen nach Kategorien

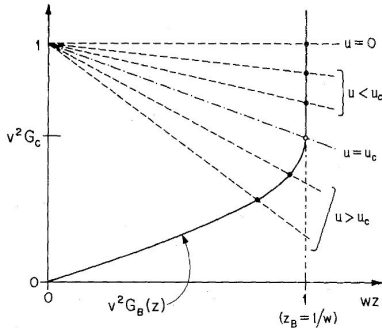
Bei Mikroorganismen gibt Körperbau und Stoffwechsel nur wenig Aufschluss \Rightarrow Klassifizierung auf Grund von DNA-Zusammensetzung

- Stapelwechselwirkung ist besonders groß wenn die Paare G–C und C–G aufeinander folgen
- Damit ist GC reiche DNA thermisch stabiler
- In den 1960ern wurde von Marmur & Doty ein etwa linearer Zusammenhang zwischen T_m und GC% entdeckt.

Kennt man die Schmelztemperatur oder die DNA Sequenz, kann auf den GC-Gehalt geschlossen werden.

GC%(Mensch) \approx 41 %

GC%(Actinobacterium) \approx 72 %



[FIS84]

$1 < \Psi < 2 \Rightarrow$ Kontinuierlicher Übergang

Aufgetragen sind die Singularitäten als Funktion von $\frac{1}{G_A(z)}$

- Singularität von $G_B(z)$ mit $\Psi = 0$ ist $z_B = 1/w$
- $\nu^2 G_B(z) = \frac{1}{G_A(z)}$ durch $G(z)$
- $1 - zu = \frac{1}{G_A(z)}$ durch Umstellen von $G_A(z)$

In die Funktion $\nu^2 G_B(z) = \frac{1}{G_A(z)}$ geht der Einfluss von Ψ durch die Entwicklung von $G_B(z)$ um $wz \rightarrow 1$ ein.

Es liegt ein kontinuierlicher Übergang für $u < u_c$ vor.