

¹H- und ¹³C-NMR-Konformationsanalysen und Minimal-Potential-Energie-Rechnungen an Desoxyguanosin-, Guanosin- und 5'-Guanosinmonophosphat-Addukten des Grenzcarcinogens 4-Methylanilin

Chris Meier und Gernot Boche*

Fachbereich Chemie der Universität Marburg,
Hans-Meerwein-Straße, D-3550 Marburg

Eingegangen am 29. Januar 1990

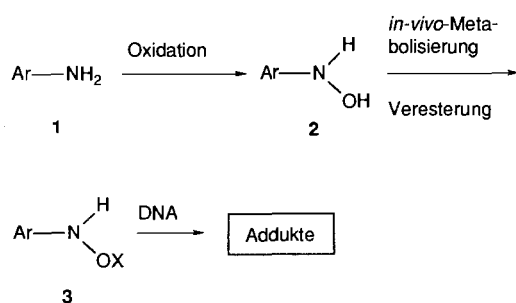
Key Words: Conformational analysis / Calculations, minimal-potential-energy / Carcinogen adducts, borderline / Nucleoside and nucleotide adducts of 4-methylaniline

¹H- and ¹³C-NMR-Conformational Analysis and Minimal-Potential-Energy Calculations with Deoxyguanosine, Guanosine and 5'-Guanosinmonophosphate Adducts of the Borderline Carcinogen 4-Methylaniline

The conformations of the C-8-nucleobase adducts of the borderline carcinogen 4-methylaniline (*p*-toluidine) *N*-(deoxyguanosine-8-yl)-4-methylaniline (**10**), *N*-(guanosine-8-yl)-4-methylaniline (**11**), and 8-(4-methylanilino)-5'-guanosinmonophosphate (**12**) have been investigated by ¹H-, ¹³C-NMR spectroscopy and "minimal-potential-energy" calculations. As far as the glycosidic bond is concerned, the ¹H- and ¹³C-NMR data show in agreement with the calculations that the nucleoside adducts **10**, **11** exist preferentially in the *anti* conformation while the 5'-phosphorylated nucleotide adduct **12** exists in the *syn* conformation. Different conformations are also observed around the backbone C-4' – C-5' bond. While the nucleoside adducts **10**, **11** show a strong preference for the *gauche-gauche* conformation (ca. 90%), nucleotide adduct **12** exists mainly in the *gauche-trans/trans-gauche* conformation

(ca. 70%). All adducts show a preference for the C-2'-*endo* conformation of the (deoxy)ribose puckering. A comparison of the conformational data of monocyclic arylamine adducts **10**, **11**, and **12** with the conformations of DNA- or oligonucleotide-bonded 2-[(deoxyguanosine-8-yl)amino]fluorene (**6**) shows, that the conformational situations in the case of the borderline carcinogen *p*-toluidine are similar to that of the strong hepatocarcinogen 2-aminofluoren (**4b**). The reasons for the different cancer-inducing potentials of borderline carcinogens like *p*-toluidine and strong carcinogens like 2-aminofluorene thus seems not to be connected with the conformational changes of the DNA double helix caused by adduct formation but rather with the *in vivo* metabolization to give the ultimate carcinogen.

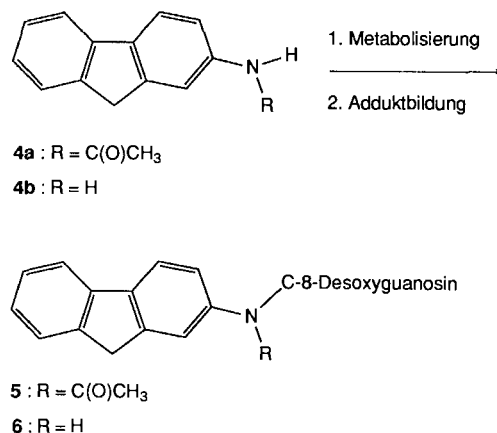
Die konformative Veränderung der DNA durch Adduktbildung mit reaktiven (ultimaten) Metaboliten chemischer Carcinogene wird als entscheidender Faktor für die biologischen Konsequenzen angesehen. Zur Gruppe der chemischen Carcinogene gehören die aromatischen Amine **1**, die *in vivo* durch *N*-Oxidation in *N*-Arylhydroxylamine¹⁾ **2** und anschließende Veresterung in „ultimate Carcinogene“ **3** (OX = Sulfat, Acetat, α -Aminoacylat, Glucuronat) übergeführt werden^{2,3)}. Verbindungen des Typs **3** reagieren dann in einer elektrophilen Aminierungs-Reaktion im wesentlichen mit der Nucleobase Guanosin zu Addukten^{3,4)}.



Die Veränderung der DNA-Struktur durch Amin-Adduktbildung wurde in früheren Arbeiten zunächst nur an *N*-acetylierten Addukten des Typs **5** untersucht⁵⁾. So verursacht die Modifizierung durch **5** eine Erniedrigung des T_m -Wertes der DNA⁶⁾ sowie eine erhöhte Empfindlichkeit der DNA gegenüber der Formaldehyd-

induzierten Entwindung des Stranges⁷⁾. Andere Autoren berichteten über einen Wechsel vom B-DNA- zum Z-DNA-Typ⁸⁾.

Bei neueren *in-vivo*- und *in-vitro*-Untersuchungen zur Adduktbildung des starken Carcinogens 2-Acetaminofluoren (**4a**) wurde jedoch als Hauptprodukt das *N*-deacetylierte Addukt 2-[(Desoxyguanosin-8-yl)amino]fluoren (*N*-dG-8-yl-2-AF) (**6**) isoliert. Das *N*-acetylierte Addukt **5** wie auch 2-Acetamino-3-(desoxyguanosin-N²-yl)fluorene waren Nebenprodukte⁹⁾.



Damit konnten erstmals auch die strukturellen Veränderungen untersucht werden, die durch *N*-deacetylierte Addukte des Typs **6**

verursacht werden¹⁰). Das gesteigerte Interesse an diesem Addukttyp resultiert aus der in vivo nachgewiesenen, vergleichsweise hohen Persistenz von **6** gegenüber **5** am intakten DNA-Strang^{9c,d}, die mit der unterschiedlichen Erkennung der Addukte durch das DNA-Reparatursystem („excision repair“) in Zusammenhang gebracht wird. Aus diesem Grund wird **6** größere Bedeutung für die Auslösung der Carcinogenese zugeordnet als **5**. Alle bisherigen Untersuchungen zur Strukturveränderung der DNA durch einen nicht-acetylierten Arylamin-Rest wurden am Addukt *N*-(dG-8-yl)-2-AF (**6**) des starken Lebercarcinogens 2-Aminofluoren (2-AF) (**4b**) durchgeführt. Dabei wurden für die aus 2-AF (**4b**) gebildete DNA-Modifikation [DNA-gebundenes *N*-(dG-8-yl)-2-AF (**6**)] drei Konformationsmodelle diskutiert: a) „outside-binding“-Modell^{11a}, b) „base-stacking“-Modell^{11b}) und c) „insertion-denaturation“-Modell^{11c}). Sie unterscheiden sich nicht nur im Ausmaß der Störung der intakten DNA-Doppelhelix, sondern auch in der Konformation um die glycosidische Bindung der modifizierten Nucleobase: während bei den ersten beiden Modellen die modifizierte Nucleobase in der *anti*-Konformation verbleibt, setzt das dritte Modell die *syn*-Konformation voraus.

Im Gegensatz zu den sehr starken Carcinogenen **4a,b** gilt das monocyclische aromatische Amin 4-Methylanilin (*p*-Toluidin) als Grenzcancerogen. Im Tierversuch wurde die Induktion von Lebertumoren bei HaM/ICR-Mäusen nachgewiesen, nachdem die Mäuse über einen Zeitraum von 6 Monaten mit hohen Dosen von *p*-Toluidin-hydrochlorid (1000 mg/kg bzw. 2000 mg/kg Nahrung) gefüttert worden waren. Charles-River-CD-Ratten zeigten bei gleicher Dosierung selbst nach 18 Monaten keine Tumorinduktion¹². Diese gattungsspezifische Tumorinduktion wurde schon bei Anilin, das ebenfalls ein Grenzcancerogen darstellt, beobachtet¹³. Im Zusammenhang mit der Carcinogenität von *p*-Toluidin ist weiterhin von Interesse, daß diese Verbindung in Ratten-Hepatozyten-Kulturen „unscheduled DNA synthesis“ (UDS) auslöst¹⁴. Bei Untersuchungen zur Mutagenität wurde 4-Methylanilin im Standard-Ames-Mutagenitätstest dagegen als „nicht mutagen“ klassifiziert¹⁵.

Im folgenden berichten wir über die konformativen Eigenschaften der bei Modellreaktionen zur Carcinogenese monocyclischer, aromatischer Amine regioselektiv aus dem DNA-Nucleosid Desoxyguanosin (dG) (**7**), dem RNA-Nucleosid Guanosin (G) (**8**) und dem RNA-Nucleotid 5'-Guanosinmonophosphat (5'-GMP) (**9**) gebildeten C-8-Addukte *N*-(Desoxyguanosin-8-yl)-4-methylanilin (**10**), *N*-(Guanosin-8-yl)-4-methylanilin (**11**) sowie 8-(4-Methylanilino)-5'-guanosinmonophosphat (**12**). Die Addukte **10–12** entstehen bei in-vitro-Reaktionen der potentiellen „ultimaten Carcinogene“ *N*-Acetoxy-4-methylanilin und *N*-(α -Aminoacyloxy)-4-methylanilin mit **7–9**, worüber wir in der voranstehenden Arbeit berichteten¹⁶.

Experimentelle Daten zur Konformation von **10–12** lieferten dynamische ¹H- und ¹³C-NMR-Untersuchungen, die wir mit berechneten Daten aus Kraftfeldrechnungen mit dem „Macromodel“-Programm verglichen haben.

Kernresonanzuntersuchungen an den Addukten **10–12**

Die 400-MHz-¹H- und 75-MHz-¹³C-NMR-Daten der Zucker-Reste der Addukte **10–12** sowie der unmodifizierten Nucleobasen **7–9** sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Die Zuordnung der ¹H-NMR-Signale erfolgte durch ihre Protonen-Kopplungsmuster¹⁷, die der ¹³C-NMR-Signale mit Hilfe der C–H-Kopplungen aus den „gated-decoupling“-Spektren.

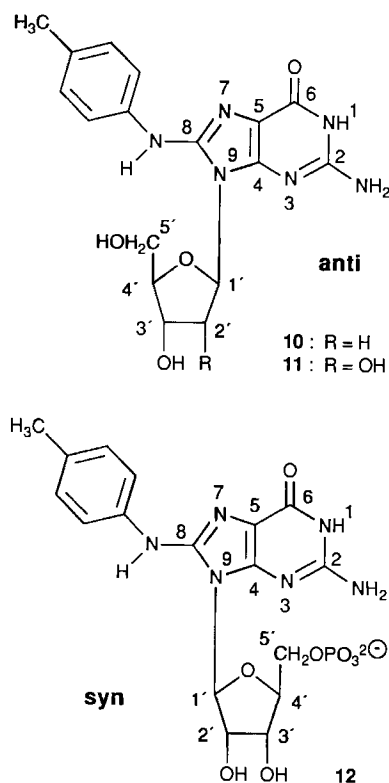


Abb. 1. Struktur und Numerierung der Addukte *N*-(dG-8-yl)-*p*-toluidin (**10**), *N*-(G-8-yl)-*p*-toluidin (**11**) und 8-(*p*-toluidino)-5'-GMP (**12**); die glycosidische Bindung (C-1'–N-9) ist in der *anti*- bzw. *syn*-Konformation dargestellt

Tab. 1. ¹H-NMR-Daten der (Desoxy-)Ribose-Protonen der Addukte **10–12**¹⁶) sowie der unmodifizierten Nucleoside **7, 8** und des Nucleotids **9**

NMR-Daten	10	Addukte 11	12	Edukte 7	8	9
δ (1'-H)	6.25	5.85	5.73	5.98	5.68	5.72
δ (2'-H _a)	2.45	4.46	4.88	2.42	4.37	4.56
δ (2'-H _b)	1.92	—	—	2.24	—	—
δ (3'-H)	4.34	4.09	4.36	4.42	4.05	4.31
δ (4'-H)	3.84	3.97	4.09	3.95	3.86	4.14
δ (5'-H _a)	3.73	3.72	3.90	3.57	3.57	3.84
δ (5'-H _b)	3.69	3.67	3.93	3.51	3.49	3.82
J (1'-H, 2'-H _a)	9.68	7.93	6.52	7.75	6.00	5.84
J (1'-H, 2'-H _b)	5.79	—	—	6.05	—	—
J (2'-H _a , 2'-H _b) ^b	13.0	—	—	13.8	—	—
J (2'-H, 3'-H)	6.00	5.54	5.87	6.24	5.24	5.10
J (3'-H, 4'-H)	0.82	1.40	3.94	2.64	3.46	3.67
J (4'-H, 5'-H _a)	1.80	1.95	4.63	3.52	3.85	3.54
J (4'-H, 5'-H _b)	2.26	2.34	5.09	4.34	4.06	3.68
J (5'-H _a , 5'-H _b) ^b	12.0	12.9	11.4	12.4	12.1	13.0
J (5'-OH, 5'-H _a)	4.75	4.47	—	5.38	5.43	—
J (5'-OH, 5'-H _b)	4.77	4.51	—	5.43	5.54	—

^a) Chemische Verschiebung δ (ppm) relativ zu TMS; Kopplungskonstanten J [Hz]; Probenkonzentration: ca. 0.1 M in [D₆]DMSO (**7, 8, 10, 11**) bzw. D₂O (**9, 12**); Meßtemperatur: 20°C. — ^b) Alle geminalen Kopplungskonstanten haben negatives Vorzeichen.

Bestimmung der Konformation um die glycosidische Bindung aus ¹H- und ¹³C-NMR-Daten

Die freie Rotation um die glycosidische Bindung C1'–N9 in β -Nucleosiden und β -Nucleotiden ist wegen des Protons

am Kohlenstoff-Atom C-2' des (Desoxy-)Ribose-Restes eingeschränkt. In allen Fällen liegt jedoch ein schnelles Gleichgewicht zwischen zwei energetisch begünstigten Konformationen vor, die man als *syn*- und *anti*-Konformation bezeichnet. Auf Grund der schnellen Konformationsänderung relativ zur NMR-Zeitskala setzen sich die Meßdaten somit aus Anteilen beider Konformationen zusammen¹⁸⁾. Zur Bestimmung der bevorzugten Konformation um die glykosidische Bindung diente zunächst die ¹H-NMR-chemische Verschiebung des Zucker-2'-Protons. Dieses erfährt durch die räumliche Nähe zu dem Guanin-N-3-Atom in der *syn*-Konformation einen entschirmenden Effekt. Da das Zucker-3'-Proton von diesem Effekt unberührt bleibt, ist die Differenz der chemischen Verschiebungen dieser beiden Protonen [$\Delta\delta(\text{H}) = \delta(3'\text{-H}) - \delta(2'\text{-H})$] ein Maß für die bevorzugte dynamische Konformation¹⁹⁾. Nach Jordan et al. gilt für Ribonucleoside, daß bei einer Differenz $\Delta\delta(\text{H}) \geq 1.00$ ppm die *anti*-Konformation überwiegt, während es bei Werten $\Delta\delta(\text{H}) \leq 1.00$ ppm die *syn*-Konformation ist^{19c)}. Die nach diesem Verfahren bestimmten Differenzen $\Delta\delta(\text{H})$ zeigen, daß das Guanosin-Addukt **11** [$\Delta\delta(\text{H}) = 1.39$ ppm] wie Guanosin (**8**) [$\Delta\delta(\text{H}) = 1.29$ ppm] und 5'-GMP (**9**) [$\Delta\delta(\text{H}) = 1.16$ ppm] bevorzugt in der *anti*-Konformation vorliegt. Die Hochfeld-Verschiebung des 2'-Protons des dG-Addukts **10** um 0.23 ppm relativ zu dG (**7**) resultiert aus einer höheren *anti*-Population (siehe Tab. 1)²⁰⁾. Im Gegensatz dazu dominiert bei dem 5'-GMP-Addukt **12** die *syn*-Konformation [$\Delta\delta(\text{H}) = 0.85$ ppm]. Wie man Tab. 1 entnehmen kann, beobachtet man im ¹H-NMR-Spektrum von **12** eine Tieffeld-Verschiebung des 2'-Protons um 0.32 ppm relativ zu dem in 5'-GMP (**9**). Hier zeigt sich die räumliche Nähe des Guanin-N-3-Atoms. Tieffeld-Verschiebungen dieser Größenordnung wurden auch bei anderen *syn*-Nucleosiden und -Nucleotiden wie z. B. bei 2-[*N*-Acetyl-*N*-desoxyguanosin-8-yl]amino]fluoren (**5**) beobachtet^{19a,b,20)}.

Aussagen über die dominante Konformation um die glykosidische Bindung lassen sich auch aus der Differenz ΔJ der vicinalen Proton-Kohlenstoff-Kopplungskonstanten ³*J*(C-8, 1'-H) und ³*J*(C-4, 1'-H) ableiten. Bei ΔJ -Werten ≤ 1.2 Hz liegt bevorzugt die *syn*- und bei $\Delta J \geq 1.2$ Hz die *anti*-Konformation vor (siehe Tab. 2)²¹⁾.

Tab. 2. Bestimmung der *syn/anti*-Prädominanz der Addukte **10**–**12** sowie der Nucleobasen **7**–**9** aus der Differenz ΔJ der vicinalen Proton-Kohlenstoff-Kopplungen ³*J*(C-8, 1'-H) und ³*J*(C-4, 1'-H)²¹⁾

	³ <i>J</i> (C-8, 1'-H) [Hz]	³ <i>J</i> (C-4, 1'-H) [Hz]	ΔJ [Hz]	<i>syn/anti</i>
10	5.63	1.33	4.30	<i>anti</i>
7	2.49	1.00	1.49	<i>anti</i>
11	5.70	3.16	2.54	<i>anti</i>
8	4.07	1.83	2.24	<i>anti</i>
12	3.16	3.81	-0.65	<i>syn</i>
9	4.00	1.80	2.20	<i>anti</i>

Wie man Tab. 2 entnehmen kann, bestätigen die Differenzen ΔJ der Kopplungskonstanten ³*J*(C-8, 1'-H) und ³*J*(C-4, 1'-H) die nach der zuvor besprochenen Methode ermit-

telten bevorzugten Konformationen: Das dG-Addukt **10** ($\Delta J = 4.30$ Hz) und das G-Addukt **11** ($\Delta J = 2.54$ Hz) liegen wie unmodifiziertes dG (**7**) ($\Delta J = 1.49$ Hz), G (**8**) ($\Delta J = 2.24$ Hz) und 5'-GMP (**9**) ($\Delta J = 2.20$ Hz) bevorzugt in der *anti*-Konformation vor, während bei dem 5'-GMP-Addukt **12** auch nach diesem Verfahren die *syn*-Konformation ($\Delta J = -0.65$ Hz) dominiert.

Bestimmung der dominanten Zucker-Faltungen aus ¹H-NMR-Daten

Außer der Konformation um die glykosidische Bindung konnte auch das dynamische Gleichgewicht der (Desoxy-)Ribose-Faltungen untersucht werden. Im allgemeinen liegen Nucleobasen entweder in der C-2'-*endo*-(*S*)- oder in der C-3'-*endo*-(*N*-)Konformation vor¹⁸⁾.

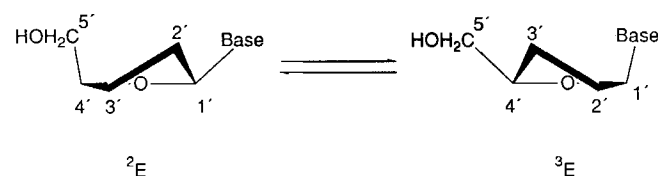


Abb. 2. Energetisch begünstigte (Desoxy-)Ribose-Faltungen

Die prozentualen Anteile der C-2'-*endo*-(²*E*-, *S*-) und C-3'-*endo*-(³*E*-, *N*-)Konformationen im dynamischen Gleichgewicht der Zucker-Faltungen lassen sich aus den Proton-Kopplungskonstanten ³*J*(1'-H, 2'-H) und ³*J*(3'-H, 4'-H) bestimmen. Dieses von Altona et al.^{22a)} und Davies²¹⁾ entwickelte Verfahren erlaubt die unabhängige Ermittlung der C-2'-*endo*-(*S*-) und C-3'-*endo*-(*N*-)Konformationsanteile X_S und X_N sowie die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K_{GI} aus dem Verhältnis von X_S zu X_N . Die hier untersuchten modifizierten und nichtmodifizierten Nucleoside und Nucleotide weisen alle K_{GI} -Werte auf, die für eine dominante C2'-*endo*-(*S*-)Konformation sprechen [siehe Tab. 3, Verfahren a)].

Davies und Danyluk^{22b)} konnten zeigen, daß die Bestimmung von K_{GI} auch direkt aus dem Verhältnis der Kopplungskonstanten ³*J*(1'-H, 2'-H) zu ³*J*(3'-H, 4'-H) möglich ist. Die nach diesem Verfahren erhaltenen K_{GI} -Werte bestätigen die nach dem ersten Verfahren erhaltenen Werte nachdrücklich [siehe Tab. 3, Verfahren b)].

Tab. 3. Berechnung der Zucker-Faltungs-Gleichgewichtskonstanten K_{GI} und der prozentualen Anteile X_N und X_S der ³*E*-(*N*-) und ²*E*-(*S*-)Konformere bei den Addukten **10**–**12**, den Nucleosiden **7**, **8** und bei dem Nucleotid **9**

	<i>J</i> (1'-H, 2'-H) [Hz]	<i>J</i> (3'-H, 4'-H) [Hz]	$X_N^a)$ (%)	$X_S^a)$ (%)	$K_{GI}^a)$	$K_{GI}^b)$
10	9.68	0.82	8.8	91.2	10.3	10.4
7	7.75	2.64	28.2	71.8	2.55	2.55
11	7.93	1.40	15.0	85.0	5.66	5.66
8	6.00	3.46	36.5	63.5	1.74	1.73
12	6.52	3.94	35.8	64.2	1.80	1.66
9	5.84	3.67	38.5	61.5	1.59	1.59

a) Verfahren a): berechnet nach Altona^{22a)} und Davies²¹⁾ mit $K_{GI} = X_S/X_N$. — b) Verfahren b): berechnet nach Davies und Danyluk^{22b)}.

Bestimmung des maximalen Torsionswinkels ν_{\max} und des Pseudorotationsphasenwinkels P der (Desoxy-)Ribose-Reste

Mit Hilfe der schon oben erwähnten Kopplungskonstanten ${}^3J(1'-H, 2'-H)$ und ${}^3J(3'-H, 4'-H)$ sowie von ${}^3J(2'-H, 3'-H)$ läßt sich nach einem graphischen Verfahren, das zum einen das Pseudorotationsprinzip und zum anderen die Karplus-Gleichung zu Grunde legt, auch der Pseudorotationsphasenwinkel P sowie der maximale Torsionswinkel ν_{\max} bestimmen²³⁾. Diese beiden Strukturparameter sind ansonsten nur aus Kristallstrukturanalysen zugänglich. Tab. 4 faßt diese Werte zusammen.

Tab. 4. Bestimmung der maximalen Torsionswinkel ν_{\max} und der Pseudorotationsphasenwinkel P_N bzw. P_S der Addukte **10–12** sowie der unmodifizierten DNA/RNA-Basen **7–9** aus den 1H -NMR-Kopplungskonstanten $J_{1,2'}$; $J_{2,3'}$ und $J_{3,4'}$; nach Guschlbauer²³⁾

	$J(1'-H, 2'-H)$ [Hz]	$J(2'-H, 3'-H)$ [Hz]	$J(3'-H, 4'-H)$ [Hz]	ν_{\max} [°]	P_S [°]	P_N [°]
10	9.68	6.00	0.82	40.6	171	9
7	7.75	6.24	2.64	39.4	173	7
11	7.93	5.54	1.40	38.5	168	12
8	6.00	5.24	3.46	39.5	169	11
12	6.52	5.87	3.94	38.5	152	28
9	5.84	5.10	3.67	40.0	170	10

Die Konformation um die exocyclische C4'–C5'-Bindung

Die Konformation um die exocyclische C4'–C5'-Bindung kann als schnelles Gleichgewicht zwischen drei energetisch begünstigten Konformationen betrachtet werden. Das Populationsverhältnis dieser gestaffelten Konformationen, die als *gauche-gauche* (*gg*), *gauche-trans* (*gt*) und *trans-gauche* (*tg*) bezeichnet werden, läßt sich aus den experimentell zugänglichen vicinalen Proton-Kopplungskonstanten ${}^3J(4'-H, 5'-H_a)$ und ${}^3J(4'-H, 5'-H_b)$ nach zwei voneinander unabhängigen Methoden erhalten²⁴⁾.

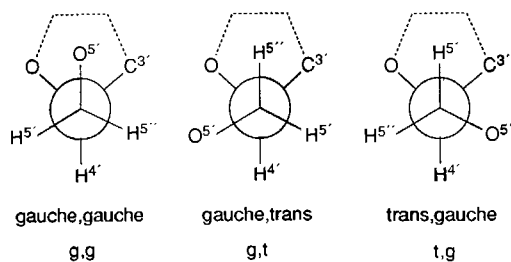


Abb. 3. Energetisch begünstigte Konformationen um die exocyclische C4'–C5'-Bindung

Die so ermittelten Populationsverhältnisse weisen einen deutlich höheren Anteil der *gg*-Konformation bei den nicht-phosphorylierten Addukten **10** und **11** (*gg*: 86–91%; *gt/tg*: 9–14%) auf, als dies bei den unmodifizierten Nucleobasen **7–9** der Fall ist. Bei diesen sind die *gg*-Konformationen nur zu etwa 50% populiert. Bei dem 5'-GMP-Addukt **12** sinkt der *gg*-Anteil auf 30–33% ab (siehe Tab. 5).

Tab. 5. Populationen der *gg*-, *gt*- und *tg*-Konformere bei den Addukten **10–12** sowie bei dG (**7**), G (**8**) und 5'-GMP (**9**)²⁴⁾

	$J(4'-H, 5'-H_a)$ [Hz]	$J(4'-H, 5'-H_b)$ [Hz]	<i>gg</i> (%)	<i>gt</i> (%)	<i>tg</i> ^{a)} (%)	<i>gg</i> (%)	<i>gt</i> (%)	<i>tg</i> ^{b)} (%)
10	1.80	2.26	91	8	1	91	8	1
7	3.52	4.34	51	28	20	56	23	21
11	1.95	2.34	87	9	4	86	9	5
8	3.85	4.06	51	25	24	48	27	25
12	4.63	5.09	33	36	31	30	38	33
9	3.54	3.68	58	22	20	56	23	21

a) Verfahren a); berechnet nach Hruska et al.^{24a)}. — b) Verfahren b); berechnet nach Kline et al.^{24b)} und DesLauriers et al.^{24c)}.

Minimal-Potential-Energie Rechnungen des Guanosin-Adduktes **11** und des 5'-Guanosinmonophosphat-Adduktes **12**

Zum Vergleich mit den NMR-Konformationsanalysen wurden die energieärmsten Strukturen des G-Adduktes **11** und des 5'-GMP-Adduktes **12** mit dem „Macromodel“-Rechenprogramm berechnet²⁵⁾. Dazu wurde von einer voroptimierten Startgeometrie ausgegangen. Zur Optimierung bei **11** wurde $\pm 180^\circ$ Rotation um die C-1'–N-9-Bindung (χ) und $\pm 120^\circ$ Rotation um die C-4'–C-5'-Bindung (γ) erlaubt, während bei **12** zusätzlich die Rotation um die C-5'–O-5'-Bindung (β) in 120° -Schritten zugelassen wurde. Die Diederwinkel aller anderen Bindungen wurden konstant gehalten.

Das globale Minimum von **11** weist folgende Eigenschaften auf: a) eine *anti*-Konformation um die glycosidische Bindung ($\chi = 138^\circ$), b) eine C-2'-*endo*-(*S*)-Ribose-Faltung und c) eine *gg*-Konformation um die C-4'–C-5'-Bindung ($\gamma = 43^\circ$). Abb. 4 zeigt eine SCHAKAL-Darstellung der energieärmsten Konformation des aminierten Nucleosids **11**.

Die für 8-substituierte Nucleoside unübliche Präferenz der *anti*-Konformation und die hohe *gg*-Population ist auf die intramolekulare Wasserstoff-Brückenbindung zwischen dem 8-NH-Proton und dem Ribose-5'-Sauerstoff-Atom zurückzuführen. Man fand sie bereits bei 8-(Alkylamino)-adenosin-Nucleosiden und -Nucleotiden^{19c,26)}, bei 2-[(Desoxyguanosin-8-yl)amino]fluoren^{20a)} (**6**) sowie bei 4-

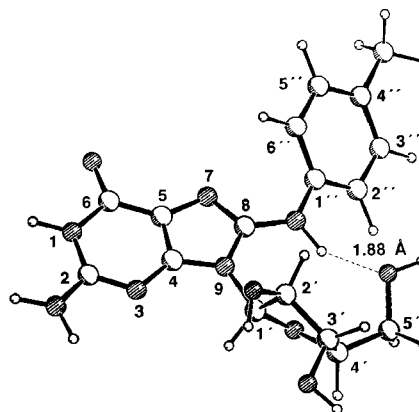


Abb. 4. SCHAKAL-Darstellung der energieärmsten *anti*-Struktur von *N*-(G-8-yl)-*p*-toluidin (**11**); berechnet mit dem „Macromodel“-Programm²⁵⁾

[(Desoxyguanosin-8-yl)amino]biphenyl^{20b}). Die Ausbildung dieser H-Brücke zeigt sich anhand des kurzen Abstandes (1.88 Å) zwischen dem Ribose-5'-Sauerstoff-Atom und dem 8-NH-Proton (siehe Abb. 4).

Im Gegensatz dazu findet man für die energieärmste Konformation des 5'-GMP-Adduktes **12** folgende Daten: a) eine *syn*-Konformation ($\chi = 44^\circ$), b) eine C-2'-*endo*-(*S*)-Ribose-Faltung, c) eine *gg*-Konformation um die exocyclische C-4'-C-5'-Bindung ($\gamma = 43^\circ$) und d) eine *gg'*-Konformation um die C-5'-O-5'-Bindung ($\beta = 112^\circ$). Die entsprechende SCHAKAL-Darstellung dieses modifizierten Nucleotids zeigt Abb. 5.

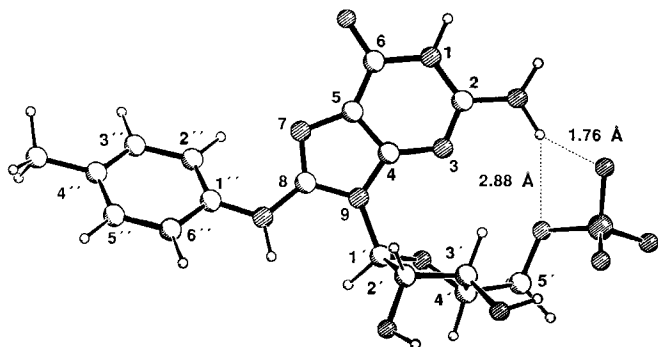


Abb. 5. SCHAKAL-Darstellung der energieärmsten *syn*-Struktur von 8-(*p*-toluidino)-5'-GMP (**12**); berechnet mit dem „Macromodel“-Programm²⁵

Aus den berechneten C-8–8-N-Bindungslängen von 1.33 Å in **11** und **12**, dem Diederwinkel um die C-8–8-N-Bindung von 37° bei dem Guanosin-Addukt **11** und von 36° bei dem 5'-GMP-Addukt **12** sowie der bathochromen Verschiebung der langwelligen UV-Absorptionsbande von **11** und **12** um 28 nm auf 282 nm ($\lg \epsilon = 4.243$) im Vergleich zu Guanosin (G) (**8**) und 5'-GMP (**9**) (254 nm) kann zum einen ein partieller Doppelbindungscharakter zwischen dem C-8- und dem 8-N-Atom und zum anderen eine teilweise Konjugation der aromatischen Reste abgeleitet werden (siehe Abb. 6).

Zusammenfassend zeigen dynamische NMR-Untersuchungen und theoretische Konformationsanalysen übereinstimmend die Umkehrung der Konformation um die gly-

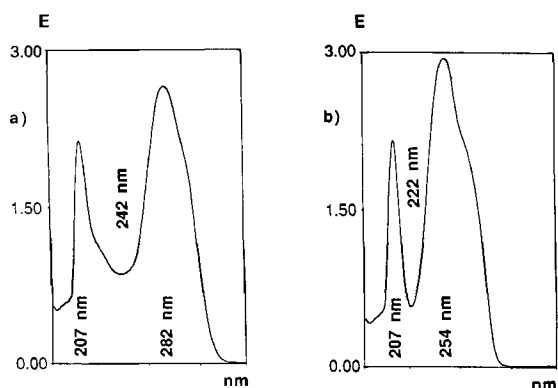


Abb. 6. UV/VIS-Spektren von N-(Guanosin-8-yl)-4-methylanilin (**11**) (a) und Guanosin (G) (**8**); Referenz: Methanol

cosidische Bindung von der im Addukt **11** dominanten *anti*-zur *syn*-Konformation in **12**. Während *syn*-Konformationen für 8-substituierte Nucleotide mit sterisch anspruchsvollen Substituenten in der 8-Position des Guanins (Brom, *tert*-Butyl, Dialkylamino und 1-Hydroxy-1-methylethyl^{19c,27}) bekannt sind und auch das *N*-acetylierte Nucleosid-Addukt 2-[*N*-Acetyl-*N*-(desoxyguanosin-8-yl)amino]fluoren²⁰ (**5**) diese Konformation besitzt, ist die hier bei **12** gefundene *syn*-Konformation überraschend, da prinzipiell eine Stabilisierung der *anti*-Konformation durch eine Wasserstoff-Brücke wie in **11** möglich ist. Tatsächlich wurde für „normale“ 8-Alkylamin-substituierte Nucleotide die Dominanz der *anti*-Konformation nachgewiesen^{19c,27}.

Die Ursachen für die Konformationsveränderung um die glycosidische Bindung bei dem 5'-phosphorylierten Addukt **12** sind derzeit nicht klar. Vermutlich ist die sterische Wechselwirkung des 5'-Phosphat-Restes mit dem 4-Methylanilin-Chromophor und die daraus folgende Möglichkeit zur Ausbildung von zwei Wasserstoff-Brückenbindungen der C-2-NH₂-Gruppe mit den Phosphat-Sauerstoff-Atomen (Abstände: 1.76 Å und 2.88 Å; siehe Abb. 5) dafür verantwortlich.

Bemerkenswert ist weiter, daß die Arylamin-Modifizierung keine Veränderung der (Desoxy-)Ribose-Faltung in **10**, **11** bzw. **12** (C-2'-*endo*) im Vergleich zu nichtmodifiziertem **7**, **8** und **9** (C-2'-*endo*) verursacht.

Die hohe *gt/tg*-Population um die exocyclische C-4'-C-5'-Bindung bei **12** wird auch bei anderen Nucleosiden und Nucleotiden mit *syn*-Konformation gefunden.

Die Konformation um die glycosidische Bindung bei **12** ist für eine Diskussion über die Strukturveränderungen der DNA-Doppelhelix von entscheidender Bedeutung.

So deuten die von anderen^{28–30} und von uns erhaltenen Ergebnisse darauf hin, daß die strukturellen Veränderungen der DNA durch *N*-acetylierte wie *N*-deacetylierte Arylamin-Addukte des Typs **5** bzw. **6**, **12** vergleichbar sein sollten, da beide in der „unnatürlichen“ *syn*-Konformation vorliegen. In jüngsten Arbeiten zur Struktur von DNA-Doppelhelices, die DNA-gebundenes *N*-(dG-8-yl)-2-AF (**6**) enthalten, konnte bei dem modifizierten Nucleotid ebenfalls die *syn*-Konformation um die glycosidische Bindung nachgewiesen werden: van Houte et al.²⁸ kamen auf Grund optischer Untersuchungsmethoden an 2-AF-modifizierter, nativer DNA zu diesem Ergebnis, Norman et al.²⁹ führten NMR-Untersuchungen und Minimal-Potential-Energie-Rechnungen an einem modifizierten Undecamer-Duplex-Oligonucleotid durch, und Pierce et al. untersuchten die UVRABC-Nuclease-Aktivität gegenüber 2-AF-modifizierter DNA³⁰.

Die übereinstimmend beobachtete *syn*-Konformation um die glycosidische Bindung unterstreicht die Bedeutung des „insertion-denaturation“-Modells^{11c} bei der Diskussion der konformativen Veränderungen des DNA-Stranges.

Weiter zeigen unsere Ergebnisse, daß es zumindest zweifelhaft, wenn nicht gar unzulässig ist, Extrapolationen ausgehend von Strukturuntersuchungen an modifizierten Nucleosiden auf Konformationsveränderungen der DNA zu ziehen. Wir haben gezeigt, daß der Übergang vom mo-

diffizierten Nucleosid zum modifizierten Nucleotid mit einer entscheidenden Änderung der Konformation um die glycosidische Bindung verbunden ist.

Fazit: Das Grenzcancerogen 4-Methylanilin und das starke Carcinogen 2-Aminofluoren (2-AF) (**4b**) verursachen auf molekularer Ebene die gleichen konformativen Veränderungen am modifizierten Nucleotid. Möglicherweise ist dies auch am intakten DNA-Strang der Fall. Dieser Befund legt den Schluß nahe, daß das unterschiedliche krebsauslösende Potential dieser beiden Verbindungen nicht auf den molekularen Strukturveränderungen beruht, sondern bei der Metabolisierung zum „ultimaten Carcinogen“ zu suchen ist.

C. M. dankt dem *Fonds der Chemischen Industrie* für ein Stipendium. Diese Arbeit wurde vom *Fonds der Chemischen Industrie*, der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und der *BASF AG* gefördert.

Experimenteller Teil

UV/VIS: Kontron Instruments Uvikon 860 UV. — NMR: Bruker AM 400 (¹H), Bruker AC 300 (¹³C).

Die Darstellung der Addukte **10–12** wurde in der voranstehenden Publikation beschrieben¹⁶⁾. Die unmodifizierten Nucleoside **7**, **8** und das Nucleotid **9** wurden von den Firmen Merck-Schuchardt, Hohenbrunn (**7**) und Sigma, Deisenhofen (**8**, **9**) bezogen.

CAS-Registry-Nummern

7: 961-07-9 / 8: 118-00-3 / 9: 85-32-5 / 10: 126788-73-6 / 11: 126788-74-7 / 12: 126788-75-8

- ¹⁾ ^{1a)} S. S. Thorgeirsson, *Biochem. Basis of Chem. Carcinogenesis* (H. Greim, R. Jung, M. Kramer, H. Marquardt, F. Oesch, Hrsg.), S. 47, Raven Press, New York 1984. — ^{1b)} M. A. Butler, F. P. Guengerich, F. F. Kadlubar, *Cancer Res.* **49** (1989) 25. — ^{1c)} P. D. Lotlikar in *Biochemical Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules* (J. W. Gorrod, L. A. Damani, Hrsg.), S. 163, VCH Verlagsgesellschaft/Ellis Horwood, Weinheim/Chichester 1985. — ^{1d)} R. N. Pandey, M. S. Clearfield, S. M. Paik, P. D. Lotlikar in *Biochemical Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules* (J. W. Gorrod, L. A. Damani, Hrsg.), S. 175, VCH Verlagsgesellschaft/Ellis Horwood, Weinheim/Chichester 1985; C. B. Frederick, J. B. Mays, D. M. Ziegler, F. P. Guengerich, F. F. Kadlubar, *Cancer Res.* **42** (1982) 2671. — ^{1e)} D. R. Doerge, M. D. Corbett in *Biochemical Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules* (J. W. Gorrod, L. A. Damani, Hrsg.), S. 107, VCH Verlagsgesellschaft/Ellis Horwood, Weinheim/Chichester 1985. — ^{1f)} H. G. Oldham, R. J. Chenery in *Biochemical Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules* (J. W. Gorrod, L. A. Damani, Hrsg.), S. 115, VCH Verlagsgesellschaft/Ellis Horwood, Weinheim/Chichester 1985.
- ²⁾ ^{2a)} R. D. Sekura, E. S. Lyon, C. J. Marcus, J. L. Wang in *Enzymatic Basis of Detoxification* (W. B. Jacobs, Hrsg.), Bd. 2, S. 199, Academic Press, New York 1980. — ^{2b)} C. C. Lai, J. A. Miller, E. C. Miller, A. Liem, *Carcinogenesis* **6** (1985) 1037. — ^{2c)} J. H. N. Meerman, A. B. D. van Doorn, J. J. Mulder, *Cancer Res.* **40** (1980) 3772. — ^{2d)} C. C. Irving, L. T. Russell, *Biochemistry* **9** (1970) 2471. — ^{2e)} F. F. Kadlubar, L. E. Unruh, T. J. Flammang, D. Sparks, R. K. Mitchum, G. J. Mulder, *Chem. Biol. Interact.* **33** (1981) 129. — ^{2f)} F. F. Kadlubar, J. A. Miller, E. C. Miller, *Cancer Res.* **37** (1977) 805. — ^{2g)} T. J. Flammang, F. F. Kadlubar, *Carcinogenesis* **7** (1986) 919. — ^{2h)} W. W. Weber, *The Acetylator Genes and Drug Response*, University Press, New York 1987. — ²ⁱ⁾ R. Kato, Y. Yamazoe, *Jpn. Cancer Soc. (Gann)* **78** (1987) 297. — ^{2j)} M. Tada, M. Tada, *Jpn. Cancer Soc. (Gann)* **65** (1974) 281. — ^{2k)} M. Tada, M. Tada, *Nature* **255** (1975) 510. — ^{2l)} D. W. Hein, *Biochim. Biophys. Acta* **948** (1988) 37.
- ³⁾ ^{3a)} F. Bosold, G. Boche, *Angew. Chem.* **102** (1990) 99; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **29** (1990) 63. — ^{3b)} M. Famulok, G. Boche, *Tetrahedron Lett.* **30** (1989) 321. — ^{3c)} M. Famulok, G. Boche, *Angew. Chem.* **101** (1989) 349; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28** (1989) 337. — ^{3d)} M. Famulok, G. Boche, *Angew. Chem.* **101** (1989) 470; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28** (1989) 468.
- ⁴⁾ ^{4a)} F. A. Beland, F. F. Kadlubar, *EHP, Environ. Health Perspect.* **62** (1985) 19. — ^{4b)} H. G. Neumann, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **112** (1986) 100.
- ⁵⁾ ^{5a)} R. P. P. Fuchs, J. F. Lefevre, J. Pouyet, M. P. Daune, *Biochemistry* **15** (1976) 3347. — ^{5b)} J. McCann, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** (1976) 950. — ^{5c)} R. L. Millette, L. M. Fink, *Biochemistry* **14** (1975) 1426. — ^{5d)} D. Grunberger, J. Nelson, C. Cantor, I. B. Weinstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66** (1970) 488.
- ⁶⁾ R. P. P. Fuchs, M. P. Daune, *Biochemistry* **11** (1972) 2659.
- ⁷⁾ R. P. P. Fuchs, M. P. Daune, *Biochemistry* **13** (1974) 4435.
- ⁸⁾ R. M. Santella, D. Grunberger, S. Broyde, B. E. Hingerty, *Nucleic Acids Res.* **9** (1981) 5459.
- ⁹⁾ ^{9a)} E. Kriek, *Chem. Biol. Interact.* **1** (1969) 3. — ^{9b)} E. Kriek, *Cancer Res.* **32** (1972) 2042. — ^{9c)} J. G. Westra, E. Kriek, H. Hittenhausen, *Chem. Biol. Interact.* **15** (1976) 149. — ^{9d)} J. H. N. Meerman, F. A. Beland, G. J. Mulder, *Carcinogenesis* **2** (1981) 413. — ^{9e)} C. C. Lai, J. A. Miller, E. C. Miller, A. Liem, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **25** (1984) 85. — ^{9f)} C. C. Lai, J. A. Miller, E. C. Miller, *Carcinogenesis* **6** (1985) 1037. — ^{9g)} C. M. King, B. Phillips, *Science* **159** (1968) 1351. — ^{9h)} C. M. King, B. Phillips, *J. Biol. Chem.* **244** (1969) 6209. — ⁹ⁱ⁾ J. R. deBraun, J. A. Miller, E. C. Miller, *Cancer Res.* **30** (1970) 577. — ^{9j)} F. A. Beland, K. L. Dooley, C. D. Jackson, *Cancer Res.* **42** (1982) 1348. — ^{9k)} M. C. Poirier, B. A. True, B. A. Laishes, *Cancer Res.* **42** (1982) 1317. — ^{9l)} M. C. Poirier, J. M. Hunt, B. A. True, B. A. Laishes, J. F. Young, F. A. Beland, *Carcinogenesis* **5** (1984) 1591. — ^{9m)} W. T. Allaben, C. C. Weis, N. F. Fullerton, F. A. Beland, *Carcinogenesis* **4** (1983) 1067.
- ¹⁰⁾ ^{10a)} M. D. Jacobsen, R. Shapiro, G. R. Underwood, S. Broyde, L. Verna, B. E. Hingerty, *Chem. Res. Toxicol.* **1** (1988) 152. — ^{10b)} R. Shapiro, G. R. Underwood, H. Zawadzka, S. Broyde, B. E. Hingerty, *Biochemistry* **25** (1986) 2198. — ^{10c)} D. D. Lasko, A. K. Basu, F. F. Kadlubar, F. E. Evans, J. O. Lay, J. M. Essigmann, *Biochemistry* **26** (1987) 3072.
- ¹¹⁾ ^{11a)} M. Leng, M. Ptak, P. Rio, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96** (1980) 1095. — ^{11b)} S. Broyde, B. E. Hingerty, *Biopolymers* **22** (1983) 2423. — ^{11c)} M. Spodheim-Maurizot, R. Saint-Ruf, M. Leng, *Nucleic Acids Res.* **6** (1979) 1683.
- ¹²⁾ E. K. Weisburger, A. B. Russfield, F. Homburger, J. H. Weisburger, E. Boger, C. G. van Dongen, K. C. Chu, *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **2** (1978) 325.
- ¹³⁾ ^{13a)} National Cancer Institute, *Carcinogenesis Testing Program: Bioassay of Aniline Hydrochloride for Possible Carcinogenicity*, NCI Tech. Rpt. Series No. 130, S. 1, Washington, NHI, US PHS, Department of Health and Human Services 1978. — ^{13b)} Chemical Industry Institute of Toxicology (CIIT), *104-Week Chronic Toxicity Study in Rats, Aniline Hydrochloride, Final Report*, Research Triangle Park, North Carolina 1982. — ^{13c)} S. Parodi, M. Pala, P. Russo, A. Zunino, C. Balbi, A. Albini, F. Valerio, M. R. Cimberle, L. Santi, *Cancer Res.* **42** (1982) 2277. — ^{13d)} D. J. McCarthy, W. R. Waud, R. F. Struck, D. L. Hill, *Cancer Res.* **45** (1985) 174.
- ¹⁴⁾ C. Z. Thompson, L. E. Hill, J. K. Epp, G. S. Probst, *Environ. Mutagen.* **5** (1983) 803.
- ¹⁵⁾ D. Zimmer, J. Mazurek, G. Petzold, B. K. Bhuyan, *Mutat. Res.* **77** (1980) 317.
- ¹⁶⁾ C. Meier, G. Boche, *Chem. Ber.* **123** (1990) 1699.
- ¹⁷⁾ S. Tran-Dinh, J. M. Neumann, T. Huynh-Dinh, J. Igoien, S. K. Kan, *Org. Magn. Reson.* **18** (1982) 148.
- ¹⁸⁾ In „standard right-handed B DNA“ (Watson-Crick-Modell) liegt jede Nucleotid-Einheit in der C-2'-endo-(²E-; S-)Konformation vor. ²E und S sind Synonyme für C-2'-endo. Entsprechend sind ³E und N Synonyme für C-3'-endo. N entspricht dem „North“- und S dem „South“-Bereich des Pseudorotationszyklus. Siehe zu dieser Nomenklatur: W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, S. 17–21, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokio 1988.
- ¹⁹⁾ ^{19a)} F. Jordan, H. Niv, *Biochim. Biophys. Acta* **476** (1977) 265. — ^{19b)} C. Giessner-Pretre, B. Pullman, *J. Theor. Biol.* **65** (1977) 189. — ^{19c)} R. Pless, L. Dudycz, R. Stolarski, D. Shugar, *Z. Naturforsch., Teil C* **33** (1978) 902. — ^{19d)} F. E. Evans, N. O. Kaplan, *J. Biol. Chem.* **251** (1976) 6791. — ^{19e)} C. H. Lee, R. H. Sarma, *J. Am. Chem. Soc.* **98** (1976) 3541.
- ²⁰⁾ ^{20a)} F. E. Evans, D. W. Miller, F. A. Beland, *Carcinogenesis* **1** (1980) 955. — ^{20b)} D. W. Roberts, R. W. Benson, J. D. Groopman,

- T. J. Flammang, N. A. Nagle, A. J. Moss, F. F. Kadlubar, *Cancer Res.* **48** (1988) 6336.
- ²¹⁾ D. B. Davies, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **12** (1978) 135.
- ²²⁾ ^{22a)} C. Altona, M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.* **95** (1973) 2333. — ^{22b)} D. B. Davies, S. S. Danyluk, *Biochemistry* **13** (1974) 4417.
- ²³⁾ W. Guschlbauer, *Biochim. Biophys. Acta* **610** (1980) 47.
- ²⁴⁾ In „standard right-handed B DNA“ (Watson-Crick-Modell) liegt eine bevorzugte *gg*-Konformation für jedes Nucleotid vor: ^{24a)} F. E. Hruska, D. J. Wood, R. J. Mynott, R. H. Sarma, *FEBS Lett.* **31** (1973) 153. — ^{24b)} D. J. Wood, R. J. Mynott, F. E. Hruska, R. H. Sarma, *FEBS Lett.* **34** (1973) 323. — ^{24c)} R. H. Sarma, R. J. Mynott, *J. Am. Chem. Soc.* **95** (1973) 6457. — ^{24d)} R. H. Sarma, C.-H. Lee, F. E. Hruska, D. J. Wood, *FEBS Lett.* **36** (1973) 157. — ^{24e)} P. C. Kline, A. S. Seranni, *Magn. Reson. Chem.* **26** (1988) 120. — ^{24f)} R. DesLauriers, R. D. Lapper, L. C. P. Smith, *Can. J. Chem.* **49** (1971) 1279.
- ²⁵⁾ ^{25a)} C. Still, *Program Macromodel Version 1.1*, Columbia University 1986. — ^{25b)} U. Burkert, N. L. Allinger, *Molecular Mechanics*, ACS Monograph 177, Washington 1982.
- ²⁶⁾ ^{26a)} F. E. Evans, C. Y. Lee, H. Kapmeyer, N. O. Kaplan, *Bioorg. Chem.* **7** (1978) 65. — ^{26b)} F. E. Evans, J. M. Wright, *Biochemistry* **19** (1980) 2113.
- ²⁷⁾ ^{27a)} P. Lassota, R. Stolarski, D. Shugar, *Z. Naturforsch., Teil C*, **39** (1984) 55. — ^{27b)} R. Stolarski, L. Dudycz, D. Shugar, *Eur. J. Biochem.* **108** (1980) 111. — ^{27c)} L. Dudycz, R. Stolarski, R. Pless, D. Shugar, *Z. Naturforsch., Teil C*, **34** (1979) 359.
- ²⁸⁾ L. P. A. van Houte, J. T. Bohma, J. T. Lutgerink, J. G. Westra, J. Retèl, R. van Groudelle, J. Blok, *Carcinogenesis* **8** (1987) 759.
- ²⁹⁾ D. Norman, P. Abuaf, B. E. Hingerty, D. Live, D. Grunberger, S. Broyde, D. J. Patel, *Biochemistry* **28** (1989) 7462.
- ³⁰⁾ J. R. Pierce, R. Case, M.-S. Tang, *Biochemistry* **28** (1989) 5821.

[39/90]