

18. Warum Pentose- und nicht Hexose-Nucleinsäuren?

Teil III¹⁾

Oligo(2',3'-dideoxy- β -D-glucopyranosyl)nucleotide ('Homo-DNS'): Paarungseigenschaften

von Jürg Hunziker²⁾, Hans-Jörg Roth²⁾, Markus Böhringer²⁾, Alfred Giger²⁾,
Ulf Diederichsen²⁾, Michael Göbel³⁾, Ravichandran Krishnan⁴⁾, Bernhard Jaun,
Christian Leumann und Albert Eschenmoser*

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Universitätstrasse 16,
CH-8092 Zürich

In Erinnerung an *Jakob Schreiber*

(13.X.92)

Why Pentose- And Not Hexose-Nucleic Acids? Part III¹⁾ Oligo(2',3'-dideoxy- β -D-glucopyranosyl)nucleotides. (‘Homo-DNA’): Base-Pairing Properties⁵⁾

The paper presents results of a comprehensive investigation on the pairing properties of homo-DNA oligonucleotides, the preparation of which has been described in *Part II* of this series [2]. The investigation was carried out by using established methods described in the literature for the characterization of oligonucleotides in the natural series, such as determination of melting temperatures of oligonucleotide duplexes by temperature-dependent UV spectroscopy, determination of thermodynamic data of duplex formation from the concentration dependence of melting temperatures, determination of pairing stoichiometry by ratio-dependent UV spectroscopy of binary mixtures of pairing partners, temperature-dependent CD spectroscopy, gel electrophoresis under non-denaturing conditions, and – in selected cases – ¹H- and ³¹P-NMR spectroscopy.

The systematic comparison of the pairing properties of homo-DNA oligonucleotides with corresponding DNA nucleotides (up to dodecamers) indicates that homo-DNA is a highly efficient, autonomous, artificial pairing system with a pairing behavior that is in part similar to, but also, in part, strikingly different from, the pairing behavior of DNA. The pairing properties established so far are listed below in a manner that reflects the sequence of subtitles in *Chapt. 2* of the text; they were determined under the conditions: H₂O, 0.15M NaCl, 0.01M Tris-HCl buffer, pH 7, oligonucleotide concentrations in the μ M range, 1:1 ratio of single strands in the case of non-selfcomplementary sequences.

¹⁾ Teile I und II der Reihe ‘Warum Pentose- und nicht Hexose-Nucleinsäuren?’ vgl. [1] und [2]. Die Arbeit gilt zugleich als 7. Mitt. in der Reihe ‘Chemie von α -Aminonitrilen’. Ein Teil der hier publizierten Ergebnisse wurde von C. L. an der Herbstversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Bern am 20.10.1989 und einer weiterer Teil von J. H. an der Herbstversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Bern am 16.10.1991 vorgetragen. Über weitere vorläufige Darstellungen von Teilergebnissen vgl. Anmerkung 1 in [1]; der darin letztzitierte Vortrag ist inzwischen im Druck erschienen [3].

²⁾ Vgl. die Promotionsarbeiten [4–8].

³⁾ Postdoktorat ETH-Zürich 1986–87; z. Zt. Institut für Organische Chemie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, D-Frankfurt/M.

⁴⁾ Postdoktorat ETH-Zürich 1986–88; z. Zt. *Roche Products Ltd.*, Bombay.

⁵⁾ *Summary* in collaboration with Prof. Dr. C. E. Wintner, Haverford College, Haverford, PA 19041-1392.

- 2.1. Adenine pairs with adenine.
- 2.2. Adenine pairs with thymine (but less strongly than with itself).
- 2.3. Guanine pairs with guanine.
- 2.4. Guanine pairs with cytosine (and more strongly than with itself).
- 2.5. Adenine also appears to pair with cytosine (if so, then less strongly than with thymine).
- 2.6. Both the purine-pyrimidine and the purine-purine pairing prefer antiparallel strand orientation.
- 2.7. Duplexes based on purine-pyrimidine pairing in the homo-DNA series are thermodynamically more stable than corresponding duplexes in the DNA series; this difference is not enthalpic but purely entropic in origin.
- 2.8. Purine-pyrimidine strands with homo-DNA backbones do not pair with base strands which are complementary, but have DNA backbones.

The pairing strengths of specific homo-DNA base pairs are found to be *quasi*-independent of the base pair sequence, to a degree comparable to that observed in the natural series. It is assumed that there exists a preferred pairing mode for each of these pairs of base partners also *quasi*-independent of the base-pair sequence. On this basis, the constitution of the base pairs is deduced from information on strand orientation (established to be antiparallel in a number of examples) together with information on the conformation of the nucleosidic bonds (established to be *anti* by NMR spectroscopy for four oligonucleotide duplexes). The pairing modes are found to be *Watson-Crick* for adenine-thymine and guanine-cytosine, and 'reverse'-*Hoogsteen* for adenine-adenine and guanine-guanine (*Chapt. 3*). All chemical and physical evidence available so far on the behavior of homo-DNA oligonucleotide complexes indicates that, under the chosen experimental conditions, the observed properties are those of oligonucleotide duplexes. An important part of the evidence comes from an extensive ^1H -, ^{31}P -, and ^{15}N -NMR analysis on the structure of the duplex of the self-complementary sequence ddGlc(A-A-A-A-T-T-T-T-T) carried out by *G. Otting* in the laboratory of *K. Wüthrich* to be described in detail in *Part IV* of this series.

The pairing priorities (G-C > A-A ~ G-G > A-T) observed in homo-DNA oligonucleotides are evidence that the *Watson-Crick* rules (G-C > A-T) are a consequence not only of the intrinsic chemical properties of the four bases, but of the specific furanose structure of the natural DNA backbone as well. There are three main structural factors whose importance for the specific properties of DNA becomes manifest through the comparison of DNA with homo-DNA and in terms of which the difference in properties of the two pairing systems are to be rationalized. These factors are (*Chapt. 5*): the helical secondary structure of DNA duplexes (*vs.* the *quasi*-linear structure of homo-DNA duplexes), the stacking distance between the base planes (optimal in DNA, too large in homo-DNA), and the high conformational flexibility of the furanose ring in DNA backbones (*vs.* the conformational rigidity of the pyranose chair in homo-DNA backbones). The main divergence in properties to be rationalized in terms of these (and presumably additional) structural factors is the uniformly higher thermodynamic stability of homo-DNA duplexes *vs.* isoconstitutional DNA duplexes, a divergence brought about by a less negative enthalpy change overcompensated by a less negative entropy change in their formation from single strands. Although a fuller rationalization must await exact information on the structure of homo-DNA duplexes by X-ray analysis (*cf.* also Discussion in *Part IV* of this series), it is tentatively proposed that the divergence in enthalpy change is related to the less than optimal base stacking in the (presumably *quasi*-linear) homo-DNA structure. The finding that entropy opposes duplex formation in the homo-DNA series less strongly than in the DNA series is considered to be – at least in part – a consequence of a higher conformational preorganization of homo-DNA single strands toward the structure of the duplex backbone.

The 2',3'-dideoxy-hexopyranose building block of homo-DNA possesses – according to the criterion of a structure's potential for constitutional self-assembly – a more complex structure than the hexose sugars of the (CH₂O)₆ family (*Chapt. 6*). In contrast to the latter, 2,3-dideoxy-hexopyranoses should not be considered to belong to the group of potentially prebiological sugars, and, therefore, the investigation of the chemistry of homo-DNA is only a model study for an exploration of the pairing properties of oligonucleotides derived from fully hydroxylated hexose sugars. Such studies are under way in our laboratory and will be reported in *Part VI* of this series. Meanwhile, *Part V* will complete the description of the homo-DNA study by discussing pairing properties of homo-DNA oligonucleotides containing the purine bases guanine, isoguanine, 2,6-diaminopurine, and xanthine.

The English Footnotes to Fig. 1–35, Schemes 1–24, and Tables 1–4 provide an extension of this summary.

1. Einleitung. – In einer einleitenden Abhandlung zu dieser Reihe [1] haben wir Problemstellung und Ziel unserer Untersuchungen über Hexose-Nucleinsäuren dargelegt und in Teil II [2] die Herstellung von Oligonucleotiden des Homo-DNS-Typs beschrieben. Hier dokumentieren und erörtern wir unsere experimentellen Beobachtungen über das Paarungsverhalten von Homo-DNS-Oligonucleotiden. Das Fazit dieser Beobachtungen ist die Einsicht, dass im Struktur-Typ der Homo-DNS ein autonomes künstliches Paarungssystem vorliegt, dessen Paarungseigenschaften von denen des Struktur-Typs der natürlichen DNS einesteils ähnlich, andernteils aber in tiefgreifender, zum Teil überraschender Weise verschieden sind. Über die Beschreibung der experimentellen Befunde hinaus werden wir die bisher beigebrachten Argumente zur konstitutionellen Zuordnung der Homo-DNS-Basenpaarungen vorbringen und dazu einige für die Paarung linearer Einzelstränge relevante, topologische Aspekte erörtern. Wir werden dann unsere Überlegungen zu den *Unterschieden* zwischen den Struktur- und Paarungseigenschaften von Homo-DNS- und DNS-Oligonucleotiden darlegen und dabei auch auf die Frage eingehen, inwiefern nun die Kenntnis des Homo-DNS-Paarungssystems zu einer Vertiefung unseres Verständnisses der natürlichen DNS beitragen kann. Schliesslich werden wir auf die Titelfrage der Abhandlungsreihe zurückkommen, deren Erörterung im Lichte der erzielten Resultate uns die Richtung der Fortsetzung der Untersuchungen über Hexose-Nucleinsäuren weist.

Die hier mitzuteilenden experimentellen Daten sind durchwegs an Oligonucleotid-Proben bestimmt worden, die – wie in der vorangehenden Arbeit [2] dargelegt – HPL-chromatographisch an einem Umkehrphasen- und/oder Ionentausch-System in unserer Einschätzung über 95% einheitlich waren. In der Wahl und in der Handhabung der experimentellen Methoden zur Charakterisierung des Verhaltens synthetischer Homo-DNS-Oligonucleotide konnten wir uns an Vorbilder halten, die sich in der natürlichen Reihe bei der Untersuchung von Oligo-2'-deoxyribonucleotiden bewährt haben, und deren Gebrauch und Leistungsfähigkeit in der Literatur gut dokumentiert sind. Es handelt sich dabei vor allem um die temperaturabhängige UV-Spektroskopie (Ermittlung der Schmelz-, d. h. Entpaarungs-Temperaturen aus Schmelzkurven) [9] und die temperaturabhängige CD-Spektroskopie [9], die UV-spektroskopische Bestimmung der (relativen) Paarungstöchiometrie [9] sowie die Beobachtung des gel-elektrophoretischen Verhaltens (vgl. z. B. [10]) unter nicht denaturierenden Bedingungen; es sind diese Charakterisierungsmethoden, welche mit Oligonucleotid-Mengen im nmol-Massstab auskommen und deshalb vor allem auch ein speeditives vergleichendes 'screening' des Paarungsverhaltens von Gruppen gezielt synthetisierter Basensequenzen ermöglichen. Erweiterten Gebrauch haben wir auch von der Möglichkeit gemacht, die thermodynamischen Parameter von Paarungsvorgängen aus der Konzentrationsabhängigkeit der Schmelz-Temperaturen der Paarungskomplexe abzuschätzen; das hierzu dienende Vorgehen ist besonders instruktiv von *Breslauer* und Mitarbeitern [11] beschrieben worden. Die hier präsentierten, UV-spektroskopisch bestimmten Schmelz-Kurven von Homo-DNS-Oligonucleotiden sind durchwegs die bei Temperaturanstieg beobachteten Kurven (ΔT in der Regel 0,5°/min); ihre 'Reversibilität' (ungefähr gleiche Lage und Form der beim Abkühlen beobachteten Kurve) ist – wo nichts anderes angegeben – experimentell nachgewiesen.

Die gegenüber den eben erwähnten Oligonucleotid-Charakterisierungsmethoden um eine Grössenordnung höhere Probe-Menge (um 50 μmol) erfordernde ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie hat uns nebst generellen Charakterisierungszwecken vorab zur Feststel-

lung des Konformationstyps (*anti* vs. *syn*) der Basenverknüpfung in (ausgewählten) Paarungskomplexen und damit zur Beschaffung einer wichtigen Teilinformation für die Zuordnung des Paarungs-Konstitutionstyps sowie der (antiparallelen vs. parallelen) Strang-Orientierung gedient. Eine zunftgerecht mehrdimensionale, auf eine möglichst vollständige Strukturbeschreibung ausgehende ^1H - und ^{31}P -NMR-spektroskopische Analyse des $(\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)_2)$ -Duplexes hat *G. Otting* im Laboratorium von *K. Wüthrich*⁶⁾ durchgeführt; darüber wird getrennt im Teil IV dieser Reihe berichtet [12]. Überdies ist im Laboratorium von *J. Richmond*⁶⁾ der Versuch einer Röntgenstruktur-Analyse des gut kristallisierenden, selbstkomplementären Homo-DNS-Duplexes $(\text{ddGlc}(\text{C-G-A-A-T-T-C-G}))_2$ im Gange, worüber gegebenenfalls in einem späteren Teil der Reihe zu berichten sein wird.

Konnte man einerseits auf dem Wege einer qualitativen Konformationsanalyse mit einiger Zuversicht zu einer Vorstellung über bevorzugte Konformationstypen eines Homo-DNS-*Einzelstrangs* gelangen (vgl. Teil I [1], und Anmerkung 17 in Teil II [2]) und hieraus die Folgerung ziehen, dass solche Stränge in einem (bzw. zwei⁷⁾) dieser Konformationstypen grundsätzlich die Voraussetzungen einer Basenpaarung erfüllen, ist es andererseits ungleich schwieriger, Prognosen über den vom Homo-DNS-Rückgrat bevorzugten Modus der Basenpaarung (*Watson-Crick* oder *Hoogsteen*) anzustellen, und zwar deshalb, weil ein solcher von den weiträumig topologischen Gegebenheiten des Homo-DNS-Einzelstrangs mitbestimmt wird, und letztere mit hoher Empfindlichkeit von der Art und dem Ausmass konformationeller Abweichungen vom idealisiert-linearen Konformationsmodell abhängen. Die experimentelle Erfahrung über Homo-DNS-Oligonucleotide hat denn auch sehr rasch eine ursprünglich vom idealisiert-linearen Einzelstrang-Modell inspirierte Paarungsprognose⁸⁾ als unzutreffend erkennen lassen, in dem sie gleich zu Beginn mit einer Überraschung, dem Phänomen der (Adenin-Adenin)-Paarung, aufwartete (vgl. unten). Dass diese Selbstpaarung in der Homo-DNS-Reihe Anlass zur Bildung stabiler Paarungskomplexe geben würde, dürfte auch rückblickend keineswegs als voraussagbar zu betrachten sein, jedenfalls nicht auf der uns zugänglichen, qualitativen Ebene.

Das Phänomen der (Purin-Purin)-Paarung hat sich in der Folge als eigentliches Spezifikum des Homo-DNS-Paarungssystems erwiesen. Dies führte uns in einer späteren Untersuchungsphase zu einer Ausweitung der Untersuchungen auf den restlichen Teil der aus chemischer Sicht natürlichen, jedoch nur zum Teil biologisch verwerteten Palette der Purin-Basen (vgl. die Diskussion in [1]), nämlich nebst Adenin und Guanin auf das Hypoxanthin, Isoguanin, 2,6-Diaminopurin und Xanthin [13]. In der vorliegenden Arbeit beschränken wir uns auf die bezüglich der biologisch relevanten Purin- und Pyrimidin-Basen sowie zusätzlich des Hypoxanthins erzielten Ergebnisse; mit dem bisher in der natürlichen Reihe nicht beobachteten Paarungsverhalten der restlichen Purin-Basen im Homo-DNS-Paarungssystem werden wir uns im Teil V der Reihe [14] befassen.

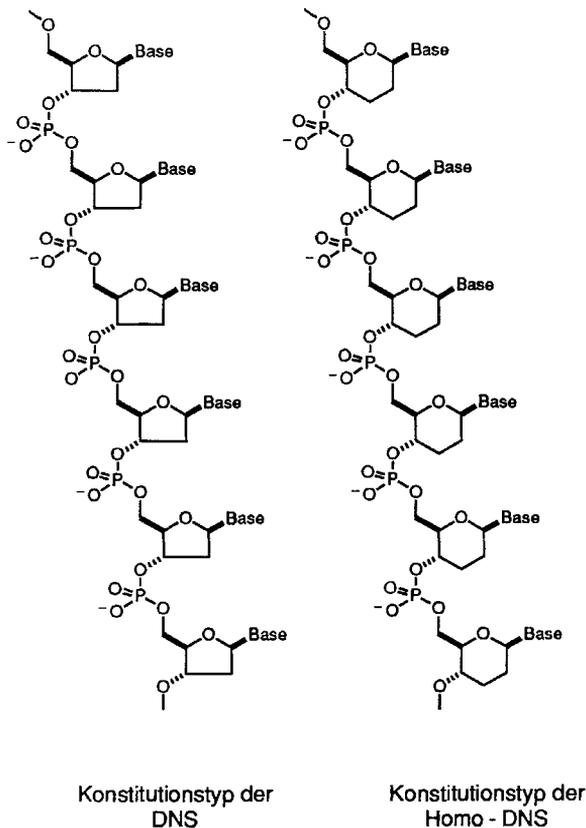
⁶⁾ Laboratorium für Molekularbiologie und Biophysik, ETH-Zürich.

⁷⁾ Als paarungsfähig haben wir jene Einzelstrang-Konformationstypen bezeichnet, in denen die *konstitutionell* repetitiven Rückgrateinheiten auch *konformationell* repetitiv sind, d. h. der Konformationstyp *-sc,ap,sc,sc,ap,-sc* (bei Voraussetzung eines *sc,sc*-Konformationstyps der Phosphodiester-Gruppierung) bzw. der Konformationstyp *ap, ap,ap,sc,ap,-sc* (bei Zulassung eines *sc,ap*-Konformationstyps der Phosphodiester-Gruppierung).

⁸⁾ Es war dies die Erwartung gewesen, dass eine *Watson-Crick*-Paarung enantiomorpher Stränge von $\text{ddGlc}(\text{A}_6)$ und $\text{ddGlc}(\text{U}_6)$ in paralleler Strang-Orientierung ein bevorzugtes Paarungsverhalten darstellen würde.

Bei der Präsentation der Befunde gehen wir nachstehend so vor, dass wir zuerst eine empirische Übersicht über die bislang festgestellten Paarungseigenschaften von Homo-DNS-Oligonucleotiden geben (*Schema 1*) und dabei den Daten der Homo-DNS-Reihe, wo immer möglich, entsprechende Daten der DNS-Reihe gegenüberstellen; die konstitutionelle Interpretation der Paarungsphänomene ist dann Gegenstand eines anschließenden eigenen Kapitels. Die Übersicht deckt die Paarungseigenschaften von ddGlc-Oligonucleotiden so weit ab, als wir sie durch UV-spektroskopische Beobachtung des Schmelzverhaltens, Aufnahme der CD-Spektren in Abhängigkeit der Temperatur sowie (in geeigneten Fällen) Ermittlung des elektrophoretischen Verhaltens unter nicht-denaturierenden Bedingungen von ddGlc-Oligonucleotiden gezielt gewählter Basen-Sequenz feststellen konnten; ¹H- und ³¹P-spektroskopische Daten, die an ausgewählten Paarungskomplexen beschafft wurden, werden im Zusammenhang mit der Zuordnung des Paarungs-Konstitutionstyps im nachfolgenden Kapitel erörtert.

Schema 1. Konstitution und Konfiguration von Homo-DNS-Oligonucleotiden im Vergleich zu DNS-Oligonucleotiden*)



*) Constitution and configuration of homo-DNA oligonucleotides as compared to DNA oligonucleotides.

Die Wahl der Basen-Sequenzen, die in die Untersuchung einbezogen wurden, ging vorab von den vom Verhalten der DNS her bekannten Paarungsregeln aus und folgte dann im wesentlichen den Erfordernissen, die sich aus den Problemstellungen der Konstitutionszuordnung sowie der Bestimmung der Strang-Orientierung ergaben. Die dabei praktizierte Strategie der Synthese gezielt konzipierter Basen-Sequenzen mit anschließendem Paarungstest ist im wesentlichen ein Konstitutionsermittlungsverfahren mittels chemischer Methoden. Es ist – beiläufig bemerkt – beachtenswert, wie weitgehend mit einem solchen Vorgehen die konstitutionellen Aspekte des Paarungsverhaltens eines oligonucleotidischen Struktur-Typs indirekt erfasst werden können.

2. Übersicht über das Paarungsverhalten von Homo-DNS-Oligonucleotiden⁹⁾. – In der nachstehenden Darstellung der Ergebnisse sind der Übersichtlichkeit halber jeweils die Schlussfolgerungen der zugehörigen Begründung und Dokumentation der Experimente vorangestellt.

2.1. Adenin paart mit Adenin. Die erste unserer experimentellen Beobachtungen zum Paarungsverhalten von Homo-DNA-Oligonucleotiden war die seinerzeit völlig unerwartete Feststellung gewesen [4], dass das aus lauter ddGlc-Adenosin-Einheiten bestehende Hexamer ddGlc(A₆) unter normalen Messbedingungen (vgl. *Exper. Teil*) der temperaturabhängigen UV-Spektroskopie eine klar sigmaoide Schmelzkurve zeigt, die sich weder durch Zugabe von (1 equiv.) ddGlc(U₆) noch enantio-ddGlc(U₆) verändert. Folgeuntersuchungen zeigten eindeutig, dass es sich hier um eine *intermolekulare Paarung zwischen Adenin-Kernen* im Verband des ddGlc-Rückgrats handelt. *Fig. 1a* zeigt den Drift der sigmaoiden Schmelzkurven von ddGlc(A_n)-Oligonucleotiden nach höheren Schmelztemperaturen mit ansteigendem Oligomerisationsgrad, *Fig. 1b* und *1c* die Abhängigkeit der Schmelztemperatur von ddGlc(A₆)-Paarungskomplexen von der Konzentration, was die *Inter* molekularität der strukturbildenden Interaktion zwischen den Adenin-Kernen nachweist. Solch einstufig-sigmaoide, sowohl mit höherem Oligomerisationsgrad als auch mit höherer Konzentration nach höheren Schmelztemperaturen sich verschiebende Schmelzkurven sind das typische Verhaltensmuster strukturell definierter, kooperativ schmelzender Oligonucleotid-Duplexe. Auffallend für die Schmelzkurven der Selbstpaarungskomplexe der ddGlc(A_n)-Oligomeren ist der im Vergleich zu den bei *Watson-Crick*-Duplexen der natürlichen Reihe (vgl. z. B. [11]) auffallend geringe Hyperchromizitätsbereich.

Das paarungstypische Verhalten der ddGlc(A_n)-Oligomeren bei der temperaturabhängigen UV-Spektroskopie findet seine Entsprechung in der Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren (*Fig. 1d*); diese reflektiert den Schmelzvorgang durch den nicht-linearen Gang der Abflachung der im unteren Temperatur-Bereich charakteristisch profilierten CD-Kurven bei schrittweiser Erhöhung der Temperatur. Die CD-Kurve des Monomeren ddGlc(A₁) (*Fig. 1e*) zeigt keine derartige Temperatur-Abhängigkeit.

Das zu ddGlc(A₆) analoge Oligonucleotid der *natürlichen* Reihe d(A₆)¹⁰⁾ verhält sich UV- und CD-spektroskopisch ganz anders (*Fig. 1f* und 2). Die zusammen mit der

⁹⁾ Zur Nomenklatur und Abkürzungssymbolik vgl. Anmerkung 8 in [2]. *Pro memoria*: Homo-DNS-Oligonucleotide = ddGlc-Oligonucleotide, 6'-Ende (primäre OH-Gruppe an C(6')) = Beginn der Oligonucleotid-Kette, bzw. des Oligonucleotid-Formelsymbols.

¹⁰⁾ Die in der vorliegenden Arbeit zu Vergleichszwecken herangezogenen Oligo-2'-deoxyribonucleotide der natürlichen Reihe (d-Oligonucleotide) wurden – sofern nicht kommerziell erhältlich – auf bekannte, der Synthese der ddGlc-Oligomere analoge Art maschinell synthetisiert und analog HPL-chromatographisch gereinigt.

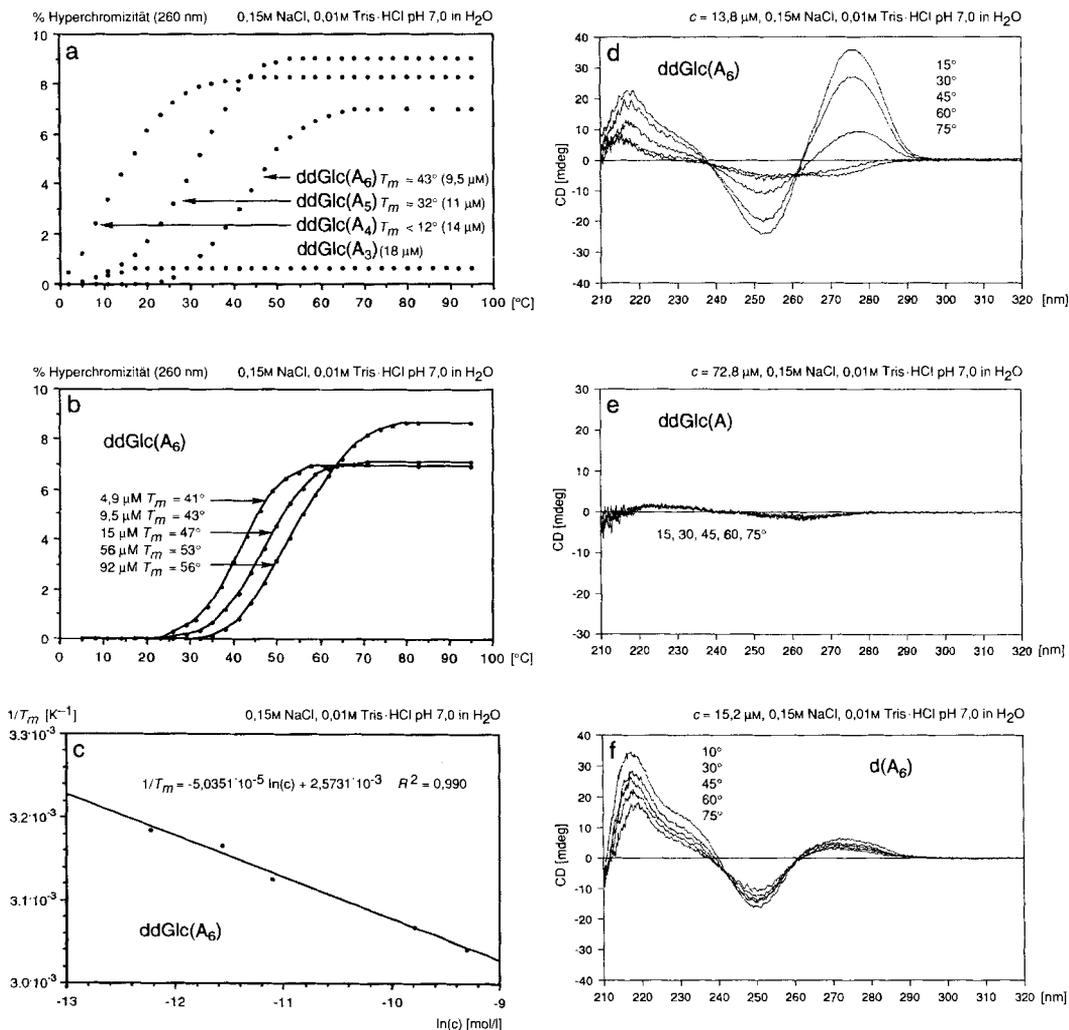


Fig. 1. Selbstpaarung von ddGlc(A_n)-Oligonucleotiden*)

*) Oligonucleotides derived from homo-deoxyadenosine (= ddGlc(A_n)) are self-paired ($n > 3$, at room temperature), in contrast to corresponding oligonucleotides derived from deoxyadenosine (= d(A_n)) of the natural series. The self-pairing of ddGlc(A_n) oligonucleotides is revealed by temperature-dependent UV spectroscopy. The sigmoid hyperchromicity curves show melting temperatures rising with increasing number of repetitive units (Fig. 1a) as well as with increasing oligonucleotide concentration, demonstrating that the pairing interaction is *intermolecular* (Fig. 1b, c). Temperature-dependent CD spectroscopy corroborates the self-pairing, as shown by comparing ddGlc(A₆) with ddGlc(A₁) (Fig. 1d, e). Deoxyadenosine-derived oligonucleotides of the natural series do not show self-pairing under the (neutral) conditions corresponding ddGlc(A_n) oligonucleotides do. This is documented by the CD spectra of d(A₆) as a function of temperature (Fig. 1f) as well as by the contrast between the UV hyperchromicity curves of d(A₆) and ddGlc(A₆) in Fig. 2a. The contrast is also manifested by the T_m curves derived from the CD spectra of ddGlc(A₆) and d(A₆) in Fig. 2b. The sigmoid curve for ddGlc(A₆) points to melting temperature of ca. 40°, in agreement with the result from UV spectroscopy.

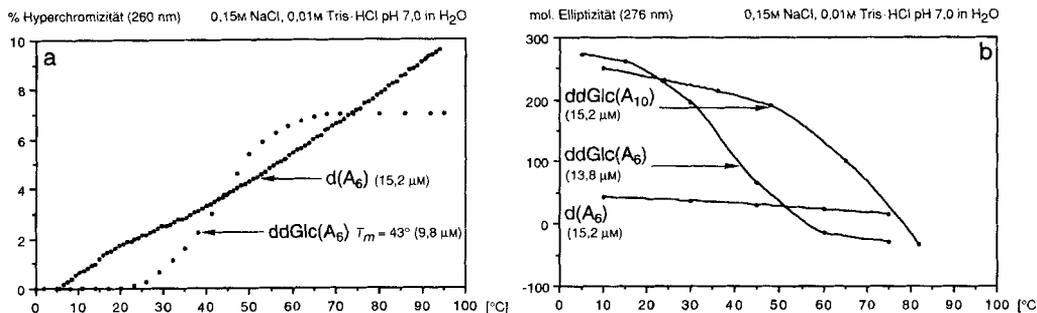


Fig. 2. Selbstpaarung von ddGlc(A_n)-Oligonucleotiden*)

*) See comments to Fig. 1.

Schmelzkurve von ddGlc(A₆) wiedergegebene (unter identischen Bedingungen ermittelte) Temperatur-Abhängigkeit der relativen Intensität der UV-Absorptionsbande von d(A₆) in Fig. 2a steigt im wesentlichen strukturlos mit höherer Temperatur an. Solches Verhalten ist für Oligoadenylsäure der natürlichen Reihe bei neutralem pH literaturbekannt [15] (S. 302) [16], es wird dort auf die Temperaturabhängigkeit einer (strukturell im Detail nicht definierten) *intra*molekularen Stapelung der Adenin-Kerne zurückgeführt¹⁾). Ein gleicherweise unmissverständlicher Gegensatz im Verhalten von ddGlc(A₆) und d(A₆) zeigt sich in der Temperatur-Abhängigkeit des CD-Spektrums: der Kurvenschar von d(A₆) in Fig. 1f fehlt der Struktur-Unterschied zwischen den Tief- und Hochtemperatur-CD-Kurven und insbesondere auch ein Driftsprung in der Kurvenschar, welcher auf das kooperative Schmelzen einer Struktur hinweisen würde. Fig. 2b zeigt die für ddGlc(A₆) und ddGlc(A₁₀) aus der Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren ermittelte Schmelzkurven; die analoge Auswertung des CD-Spektrums für d(A₆) erzeugt keine solche Schmelzkurve.

Bei gezielten Abweichungen von der Standard-Zusammensetzung der Mess-Lösungen (0,15M NaCl, 0,01M Tris-Puffer, pH 7,0) zeigt ddGlc(A₆) folgendes Verhalten: Die Schmelztemperatur ist in der für Oligonucleotide des DNS-Typs bekannten Weise [15] (S. 145) [19] von der Salz-Konzentration abhängig (Fig. 3a). Im Bereich von 0,015 bis 1,5M NaCl nimmt sie bei ansteigender Salz-Konzentration mit einer ($dT_m/d \ln(c)$)-Steigung von +2°/(mol/l) stetig zu (Fig. 3b); der Anstieg ist indessen deutlich flacher als der bei *Watson-Crick*-Oligonucleotiden des DNS-Typs beobachtete (ca. +8°/(mol/l), vgl. [20]). Zunehmende Mengen Harnstoff in der Mess-Lösung verschieben die Schmelztemperatur von ddGlc(A₆) – ebenfalls einem von Oligonucleotiden der natürlichen Reihe bekannten Verhaltensmuster entsprechend – nach tieferen Werten. In 16M Harnstoff-Lösung ist die ddGlc(A₆)-Paarungsstruktur vollends denaturiert (Fig. 3c).

Die Schmelztemperatur (UV) von ddGlc(A₆) ist im pH-Bereich von 9 bis 5 von der Azidität der Mess-Lösung unabhängig, und das Oligomer überstand jeweils das Schmelz-Experiment konstitutionell unbeschadet (HPLC). Nach einem Schmelz-Experiment bei

¹⁾ Polyadenylsäure bildet eine Doppelhelix unterhalb pH-Werten von 4, d. h. wenn Adenin-Kerne in protonierter Form vorliegen [15] (S. 305) [17] [18], vgl. auch Kap. 3.2.

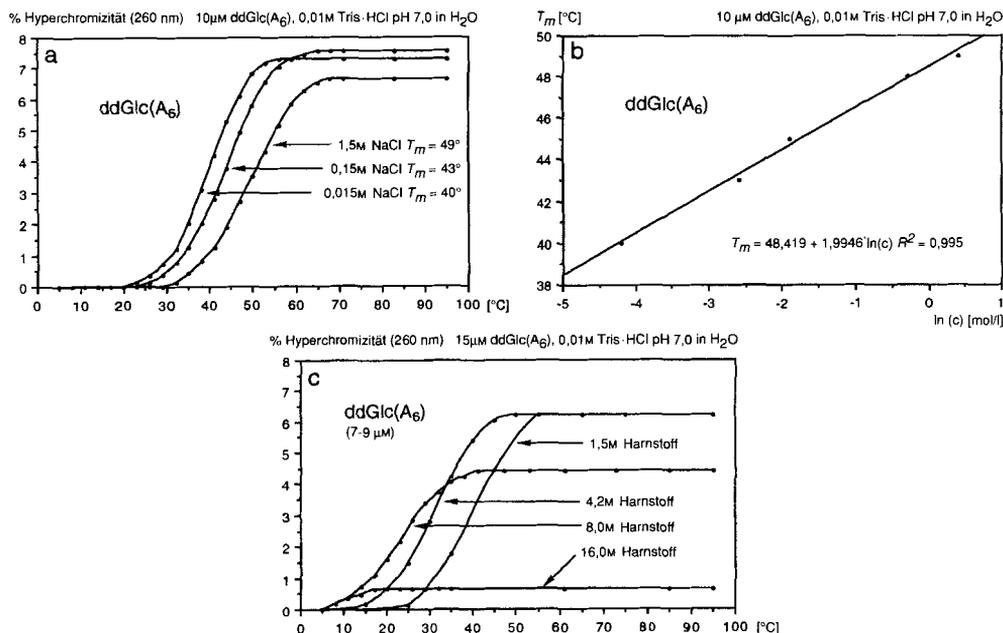


Fig. 3. Einfluss der Salz-Konzentration und von Harnstoff auf die Selbstpaarung von ddGlc(A₆)*

- *) The self-pairing of ddGlc(A₆) depends on salt concentration in a manner similar to that of natural (purine-pyrimidine-paired) oligonucleotides: T_m values increase with increasing salt concentration (Fig. 3a); however, the slope of T_m vs. ln(c) is not as steep as that for natural oligonucleotides. On the other hand, T_m values decrease with increasing urea concentration (Fig. 3c); in 16 M urea solution ddGlc(A₆) is completely denatured.

pH 4 zeigte indessen die HPLC teilweise Zersetzung an (vermutlich Depurinisierung [21]) und bei einem Experiment bei pH 3,5 entsprach die (bei um ca. 10° tieferen Werten liegende) Schmelz-Kurve einem vollends irreversiblen Vorgang (über Einzelheiten vgl. [5] S. 69).

Wir haben ddGlc(A_n)-Oligomere vorderhand bis zu einer Kettenlänge von n = 10 bzw. 12 hergestellt und charakterisiert. Um diesen Oligomerisationsgrad zeigte sich einerseits die Grenze der sauberen präparativen Abtrennbarkeit von (n - 1)-Oligomeren mit den von uns verwendeten HPLC-Systemen an, und andererseits stiess die UV-spektroskopische Schmelzkurvenbestimmung unter Standardbedingungen beim Oligomer n = 12 (T_m über 80°, c = 4,6 μM) an ihre Grenzen. Aus der zugehörigen Schmelzkurve ist zu vermuten, dass höhere ddGlc(A_n)-Oligomere ein komplexes inter- und intramolekulares Paarungsverhalten aufweisen könnten.

Unsere Befunde zur Frage der Strang-Orientierung, Strang-Multiplizität sowie der thermodynamischen Daten von Adenin-Adenin-Paarungskomplexen sind weiter unten (vgl. Kap. 2.6 und 2.7) behandelt.

2.2. Adenin paart mit Thymin (aber schwächer als mit sich selbst). Wie Fig. 4a dokumentiert, erfährt die Schmelz-Kurve von ddGlc(A₆) (Standardbedingungen) durch Zugabe einer äquimolaren Menge des Homothymidin-Hexamers ddGlc(T₆) zur Mess-Lösung

keine Veränderung, die resultierende Extinktionskurve erscheint im wesentlichen als Addition der Individualkurven von $ddGlc(A_6)$ und $ddGlc(T_6)$, indem der Extinktionswert für $ddGlc(T_6)$ von der Temperatur nahezu unabhängig ist. Das Misch-Experiment mit $ddGlc(A_6)$ und $ddGlc(T_6)$, in welchem das Misch-Verhältnis der beiden Komponenten zwischen 100:0% und 0:100% variiert, zeigt eine *lineare* Abhängigkeit der UV-Extinktion (260 nm) vom Misch-Verhältnis; auch dies belegt, dass der Selbstpaarungskomplex von $ddGlc(A_6)$ und der Einzelstrang $ddGlc(T_6)$ unter den Mess-Bedingungen keine (UV-spektroskopisch sich äussernde) Reaktion miteinander eingehen (Fig. 4c)¹². Wie sich demgegenüber entsprechende Oligomere der *natürlichen* Reihe, d. h. die Decameren¹³ $d(A_{10})$ und $d(T_{10})$ bei analogem Vergleich verhalten, zeigen Fig. 4b und 4d: hier stellt die Schmelz-Kurve des (1:1)-Gemisches *nicht* die Addition der beiden Individualkurven, sondern die Kurve eines sich aus $d(A_{10})$ und $d(T_{10})$ bildenden, bei 34° schmelzenden Paarungskomplexes dar, und das entsprechende (der Literatur [22] entnommene) Misch-Experiment (Fig. 4d) zeigt zwei unterschiedliche, beim (1:1)-Verhältnis sich schneidende Bereiche linearer Abhängigkeit der UV-Extinktion vom $(d(A_{10})/d(T_{10}))$ -Misch-Verhältnis, was die Bildung eines Paarungskomplexes mit (1:1)-Paarungsstöchiometrie belegt. Analoges dokumentiert die Gegenüberstellung der CD-Kurven von $ddGlc(A_{10})$ vs. $d(A_{10})$, $ddGlc(T_{10})$ vs. $d(T_{10})$ und den (1:1)-Gemischen $ddGlc(A_{10})/ddGlc(T_{10})$ vs. $d(A_{10})/d(T_{10})$ in Fig. 5 sowie das in Fig. 6 wiedergegebene Verhalten der gleichen Vergleichspartner bei der Gel-Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Der Homo-DNS-Selbstpaarungskomplex von $ddGlc(A_{10})$ ¹⁴ läuft vergleichbar weit wie der $(d(A_{10})/d(T_{10}))$ -Duplex der natürlichen Reihe. Die Oligomere $ddGlc(T_{10})$ und $d(T_{10})$ wandern ebenfalls vergleichbar weit, als Einzelstränge aber deutlich weiter als die Duplexe von $ddGlc(A_{10})$ ¹⁴ und $d(A_{10})/d(T_{10})$. Im Gegensatz zu $ddGlc(A_{10})$ läuft $d(A_{10})$ offenbar als Einzelstrang. Ein (1:1)-Gemisch von $ddGlc(A_{10})$ und $ddGlc(T_{10})$ schliesslich zeigt nicht wie das Vergleichspaar der natürlichen Reihe einen einheitlichen (Duplex-)Fleck, sondern zwei Flecken, jenen des Selbstpaarungskomplexes von $ddGlc(A_{10})$ und jenen des Einzelstrangs $ddGlc(T_{10})$.

Der erste Hinweis darauf, das es eine (Purin-Pyrimidin)-Paarung zwischen Adenin und Thymin (bzw. Uracil) in der Homo-DNS-Reihe gibt, hatten wir seinerzeit aus dem

¹²) Dieses Experiment wurde erst viel später im Hinblick auf die Möglichkeit der Bildung eines (Adenin-Adenin-Thymin)-Triplexes angestellt. Führte man es in Gegenwart von Mg^{++} -Ionen (0,05M $MgCl_2$ anstelle von 0,15M NaCl, vgl. z. B. [22]) durch, so beobachtete man zwei sich andeutende Bereiche *quasi*-linearer Abhängigkeiten mit leicht unterschiedlicher Steigung, die sich (schleifend) beim Verhältnis $ddGlc(A_6)/ddGlc(T_6)$ von ca. 2:1 schnitten. Ein solches, auf die Bildung von (A-A-T)-Triplexen hinweisendes Verhalten zeigte sich auch in orientierenden Experimenten mit $ddGlc(A_{10})$ und $ddGlc(T_{10})$ bei 0°, und zwar in sowohl 0,05M $MgCl_2$ als auch 0,15M NaCl. Das Gemisch der Decameren zeigte zwei Stufen der Schmelz-Kurve bei Misch-Verhältnissen (A zu T) von sowohl 2:1 als auch 1:1 ($T_m \approx 20^\circ$ und 75° bei ca. 10 μM). Das in Fig. 5a abgebildete CD-Spektrum des (1:1)-Gemisches differenziert möglicherweise nicht zwischen dem (A-A)-Duplex und dem (A-A-T)-Triplex (vgl. hiezu [23]). Eine abgesicherte, experimentelle Untersuchung der Bildung $ddGlc((A_n)_2/(T_n))$ -Triplexen steht bislang aus, doch ist auf Grund der vorliegenden Anhaltspunkte zu erwarten, dass die Bildung solcher Triplete unter Standardbedingungen bei genügend hoher Kettenlänge ($n > 6$) zum Paarungsverhalten von Homo-DNS-Oligonucleotiden gehört (vgl. Diskussion zu Schema 21).

¹³) Es ist hier das Decamer anstelle des Hexamers zum Vergleich herangezogen, weil in der natürlichen Reihe $(d(A)/d(T))$ -Hexamerduplexe unter den gewählten Bedingungen unterhalb 0° schmelzen, entsprechende $(ddGlc(A)/ddGlc(T))$ -Hexamerduplexe der Homo-DNS-Reihe jedoch um 30° (vgl. Fig. 7).

¹⁴) Zur Frage der Duplex-Natur der Selbstpaarungskomplexe $ddGlc(A_n)$ ($n = 4-10$), vgl. Kap. 2.7.

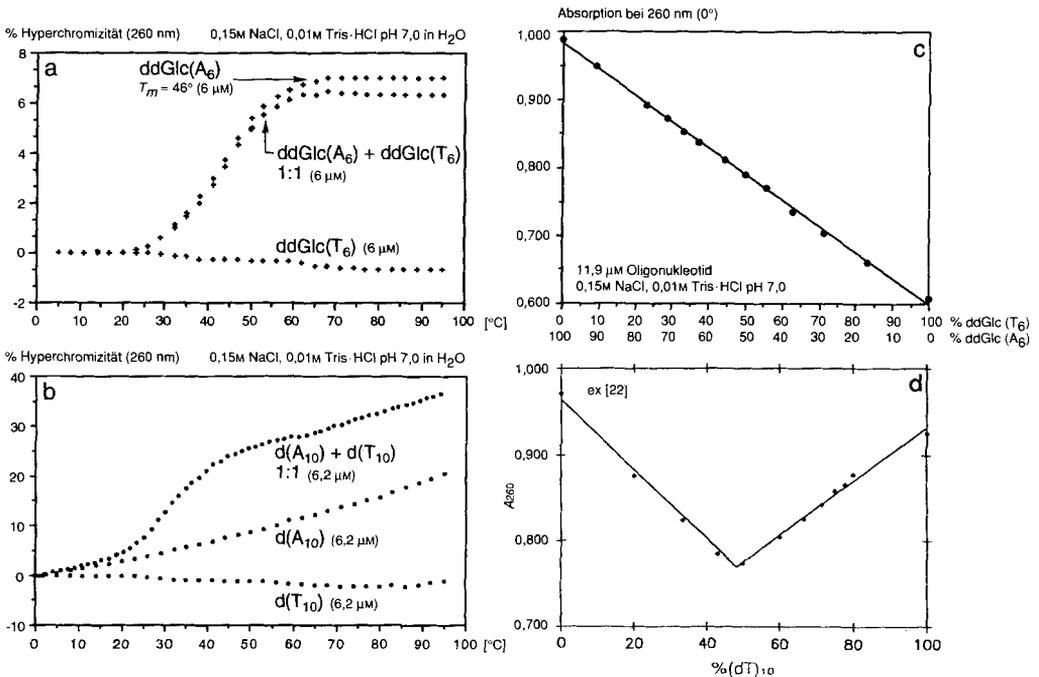


Fig. 4. Selbstpaarung von ddGlc(A₆) in Gegenwart von ddGlc(T₆)*

*) The self-pairing of adenine in ddGlc(A₆) does not change to A-T pairing in the presence of 1 mol-equiv. of ddGlc(T₆). The UV hyperchromicity curve of ddGlc(A₆) is essentially unaltered upon addition of 1 mol-equiv. of (single-stranded) ddGlc(T₆) (Fig. 4a), and the UV absorption (260 nm, 0°) of ddGlc(A₆)/ddGlc(T₆) mixtures varies linearly with the concentration ratio. The relevance of these observations is illustrated by comparing them with those from the natural series (Fig. 2b, d; d-decamers instead of d-hexamers are used, because the duplex d(A₆)/d(T₆) melts at low temperature under the conditions used). Based on these observations, it must be the case that in the homo-DNA system adenine-adenine self-pairing is stronger than adenine-thymine pairing.

Paarungsverhalten von alternierend-selbstkomplementären ddGlc(A-T)-Basensequenzen bekommen. Fig. 7 zeigt die Schmelz-Kurven von ddGlc((A-T)_n)-Oligomeren mit n = 3–6: ihre Form und der sukzessive Anstieg des Schmelzpunktes vom Hexameren (n = 3, T_m = 28°) zum Dodecameren (n = 6, T_m = 67°) belegen die Bildung von zunehmend stabileren Paarungskomplexen. Es handelt sich hierbei offenbar um (A-T)-Paarung: die gegenüber (A-A)-Selbstpaarungskomplexen ca. dreifach höhere Hyperchromizität und die CD-Spektren (vgl. unten) sowie der Vergleich dieser Eigenschaften mit jenen der Block-Oligomeren ddGlc(A_m-T_n) (vgl. unten) widersprechen der formal möglichen Alternative einer alternierend unterbrochenen (A-A)-Paarung. Der Schar der ddGlc((A-T)_n)-Schmelz-Kurven ist eine entsprechende Kurvenschar gegenübergestellt, welche unter (im wesentlichen) identischen Mess-Bedingungen mit den d((A-T)_n)-Oligomeren der natürlichen Reihe ermittelt wurde. Der Vergleich der Kurvenscharen und entsprechenden Schmelzpunkte exemplifiziert einen Befund, der sich in der Folge bei sämtlichen experimentellen Vergleichen konstitutionell analoger Oligonucleotid-Duplexe der Homo-

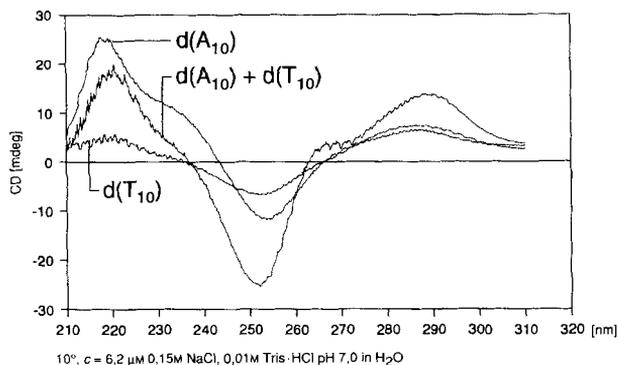
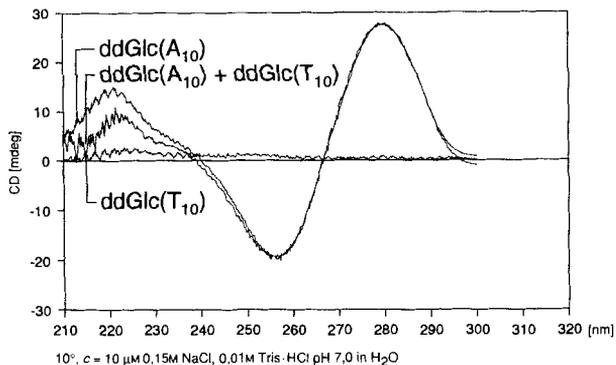
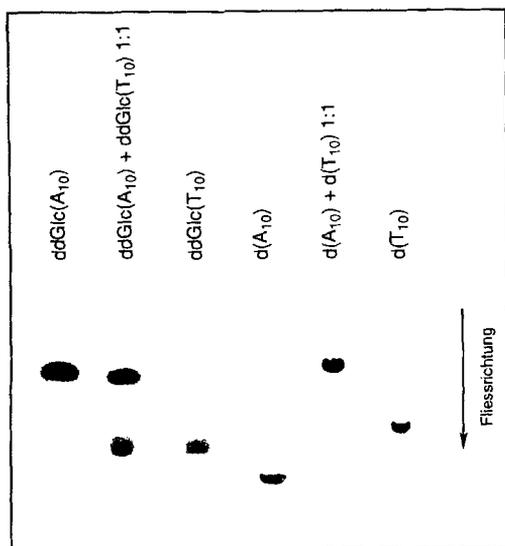


Fig. 5. CD-Spektren von $ddGlc(A_{10})$ in Ab- und Anwesenheit von $ddGlc(T_{10})$ *

*) CD Spectroscopy corroborates the conclusions outlined in the comments to Fig. 4 (mixtures in 1:1 ratio).



20% Polyacrylamid, 0,09M Tris B(OH)₃, 0,05M MgCl₂
3 nM Oligonukleotid/Bahn, 10 W, 20 h, RT., Detektion mit 'stains all'

Fig. 6. Gel-Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen von $ddGlc(A_{10})$ in Ab- und Anwesenheit von $ddGlc(T_{10})$ *

*) Gel electrophoresis under non-denaturing conditions provides further corroboration: $d(T_{10})$, $d(A_{10})$, and $ddGlc(T_{10})$ are considered to run as single strands, and the 1:1 mixture of $d(A_{10})$ and $d(T_{10})$, as a duplex. The running position of $ddGlc(A_{10})$ is compatible with the supposition that it runs as a duplex (and not as a higher-order complex; cf. further discussion below). The 1:1 mixture of $ddGlc(A_{10})$ and $ddGlc(T_{10})$ runs as the $ddGlc(A_{10})$ duplex and the $ddGlc(T_{10})$ single strand.

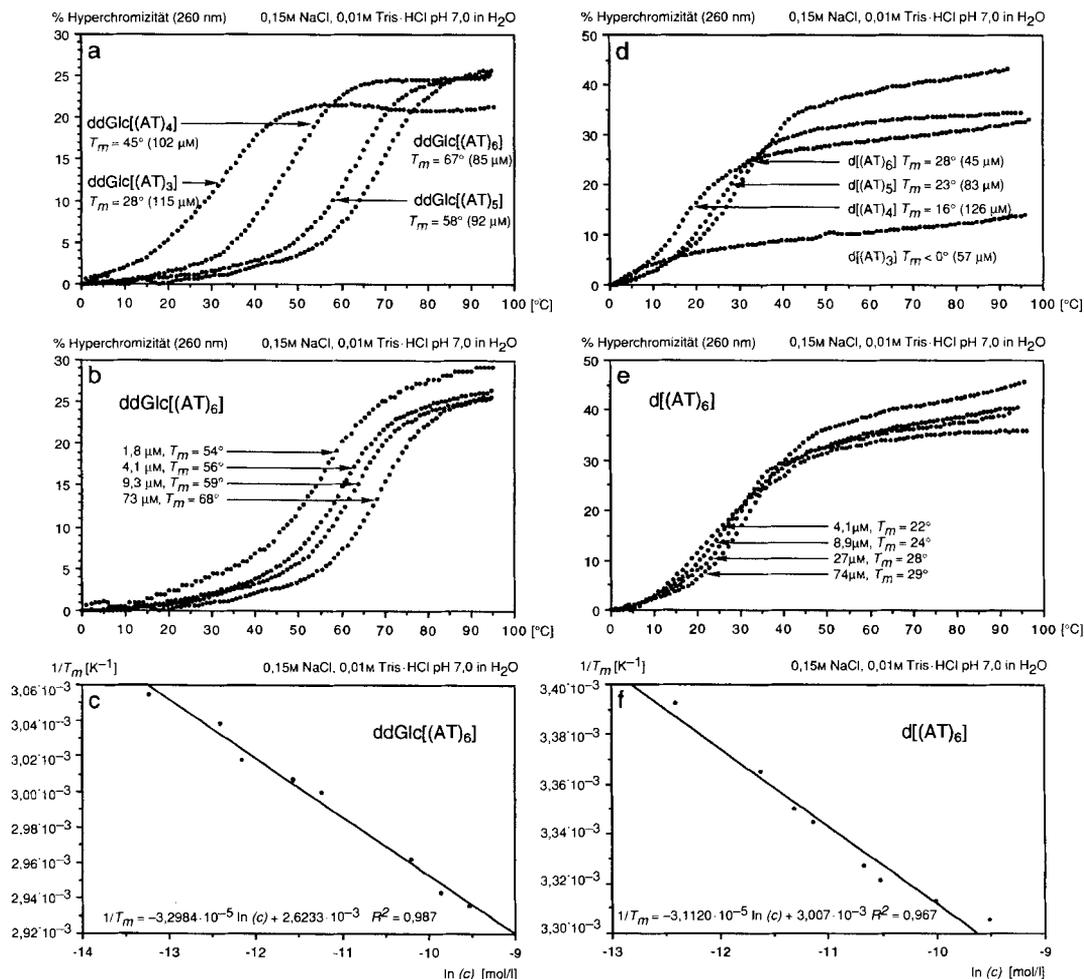


Fig. 7. Selbstpaarung von ddGlc((A-T)_n-Oligonucleotiden*)

*) Temperature-dependent UV spectroscopy of self-complementary (referring to antiparallel strand orientation) (A-T)_n-oligomers (n = 3–6) reveals hyperchromicity curves which are analogous in the DNA and homo-DNA series, but which show the following deviations: melting temperatures of the (duplexes of) ddGlc oligomers are consistently higher by ca. 30–40° than those of the corresponding d-oligomers, and the (maximal) hyperchromicities are uniformly lower in the homo-DNA series (Fig. 7a, d). Not shown are the data which demonstrate that corresponding similarities and deviations hold for the self-complementary block oligomers ddGlc(A-A-A-A-T-T-T-T-T) (henceforth, A₅-T₅) (T_m = 59°, c = 48 μM) and d(A₅-T₅) (T_m = 33°, c = 50 μM). Fig. 8 shows that, whereas the CD spectra of ddGlc(A₅-T₅) and ddGlc((A-T)₅) show a strong resemblance, they both are characteristically different from the CD spectra of ddGlc(A_n) oligomers, illustrating the shift from adenine-adenine to adenine-thymine pairing.

DNS- und DNS-Reihe bestätigen sollte: *Homo-DNS-Duplexe schmelzen durchwegs höher als entsprechende DNS-Duplexe.* Auf diese Eigenschaft der Homo-DNS-Oligonucleotide wird unten näher eingegangen (vgl. Kap. 2.7).

Die temperaturabhängigen CD-Spektren von (A-T)-gepaarten Duplexen der Homo-DNS-Reihe zeigen nicht nur (wohl kaum als überraschend zu empfindende) Unterschiede zu den CD-Spektren entsprechender Oligonucleotide der DNS-Reihe, sondern sie sind auch in charakteristischer, für empirisch-diagnostische Zwecke brauchbarer Art verschieden von den CD-Spektren (A-A)-paarender Oligonucleotide der Homo-DNS-Reihe. Fig. 8 illustriert solche Vergleiche. Die darin zum Ausdruck kommenden Unterschiede innerhalb der Homo-DNS-Reihe sind – soweit wir bislang feststellten – für (A-T)(bzw. U)- vs. (A-A)-Paarung im engeren, und für (Purin-Pyrimidin)- vs. (Purin-Purin)-Paarungen im weiteren Sinne repräsentativ (vgl. unten). Ein Beispiel der diagno-

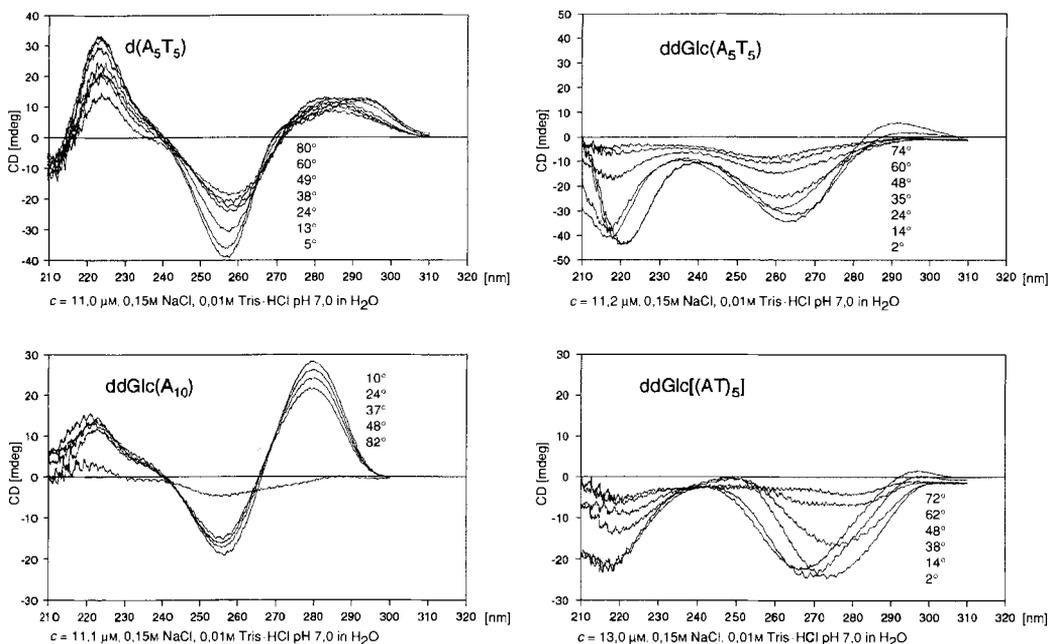


Fig. 8. Temperatur-abhängige CD-Spektren von (Adenin/Thymin)-haltigen ddGlc-Oligonucleotiden *)

*) See comments to Fig. 7.

stischen Anwendung der CD-Spektren für die Erkennung des im Duplex vorliegenden Paarungstyps gibt in Fig. 9 enthaltene Vergleich der beiden ddGlc(A-T)-Decamere ddGlc(A₅T₅) und ddGlc(A₆T₄). Der eindeutige Wechsel des CD-Spektrums vom (A-T)-Paarungstyp zum (A-A)-Paarungstyp nach Ersatz der innersten Thymin-Einheit in ddGlc(A₅T₅) durch eine Adenin-Einheit zum ddGlc(A₆T₄) deutet an, dass der Duplex des letzteren Oligonucleotids nicht mehr (A-T)-gepaart, sondern nunmehr (A-A)-gepaart ist (d. h. analog wie in ddGlc(A₆), vgl. Formelbilder¹⁴) und CD-Kurven in Fig. 9). Dieses Kippen von einem Paarungstyp zum andern findet seinen Ausdruck auch im UV-spektroskopischen Vergleich (Fig. 9d-f): während die Hyperchromizität in der Schmelz-

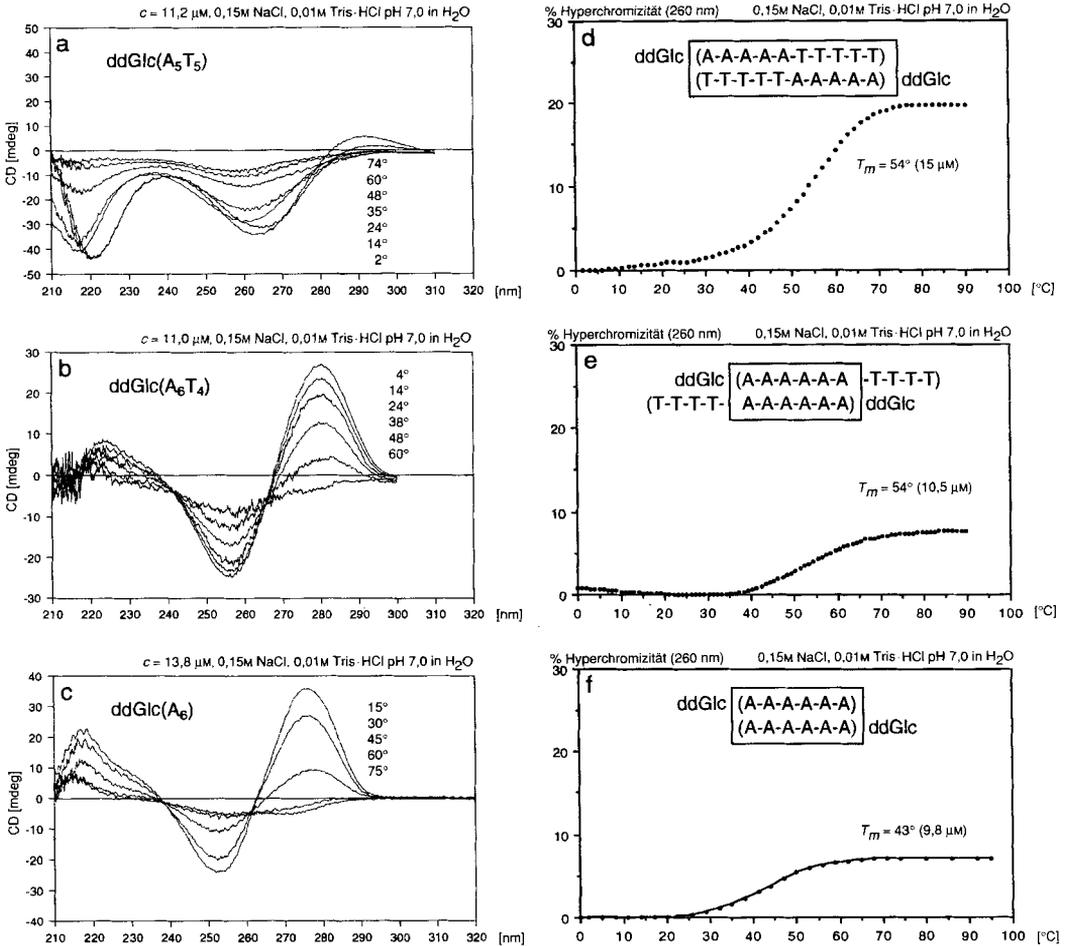


Fig. 9. (Purin-Pyrimidin)- vs. (Purin-Purin)-Paarung in (Adenin/Thymin)-haltigen ddGlc-Oligonucleotiden*)

*) Both the temperature-dependent CD spectrum (Fig. 9a, b) and the UV-hyperchromicity curve (Fig. 9d, e) change markedly, when the base sequence of ddGlc(A₅-T₅) is changed to ddGlc(A₆-T₄), thereby destroying the base sequence's self-complementarity. The CD data for ddGlc(A₆-T₄) clearly are indicative of A-A pairing, as shown by comparison with the juxtaposed CD spectrum of ddGlc(A₆) (Fig. 9c). The conclusion is corroborated by the hyperchromicity curve of ddGlc(A₆-T₄), which displays the low value of ca. 8%, characteristic for ddGlc(A_n) oligomer complexes (Fig. 9f). The antiparallel strand orientation, as well as the duplex (vs. complexes of higher order) structure depicted in Fig. 9f, are anticipatory of conclusions reached later in this paper.

punktskurve von ddGlc(A₅-T₅) den für (A-T)-paarende Homo-DNS-Duplexe durchschnittlichen Wert von ca. 20–25% aufweist¹⁵⁾, fällt diese beim Übergang zu ddGlc(A₆-T₄) auf einen für (A-A)-selbstpaarende Homo-DNS-Oligonucleotide charakteristisch

¹⁵⁾ Beachte die rund doppelt so hohe Hyperchromizität des entsprechenden Oligonucleotids in der natürlichen Reihe (Fig. 7d und 9d).

tiefen Wert zwischen 5–10%. Schliesslich spiegelt sich der Wechsel im Paarungstyp auch noch in der Schmelz-Temperatur der Paarungskomplexe. Geht man vom $T_m = 51^\circ$ ($c = 12,5 \mu\text{M}$) für $\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)$ aus, so wäre für $\text{ddGlc}(\text{A}_6\text{-T}_4)$ bei gleichbleibendem Paarungstyp ein um 5–10° tieferer Wert zu erwarten ($\text{ddGlc}(\text{A}_4\text{-T}_4)$: $T_m = 32^\circ$, $c = 13,0 \mu\text{M}$ [4]); der Paarungstyp-Wechsel führt indessen für $\text{ddGlc}(\text{A}_6\text{-T}_4)$ zu einem T_m -Wert von 54° ($c = 10,5 \mu\text{M}$). Die Diskrepanz zu 43° ($c = 9,8 \mu\text{M}$) bzw. 47° ($c = 15,1 \mu\text{M}$) für $\text{ddGlc}(\text{A}_6)$ ist nur eine scheinbare, denn der T_m -erhöhende Effekt von überhängenden Nucleotid-Einheiten an den Kettenenden von Duplexen ('dangling ends') ist in der natürlichen Reihe wohlbekannt¹⁶⁾ und in der Homo-DNS-Reihe ebenfalls beobachtet (vgl. Kap. 2.3).

Die durch den Paarungstyp-Wechsel beim Übergang von $\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)$ zu $\text{ddGlc}(\text{A}_6\text{-T}_4)$ augenfällig gewordene Existenz einer (Adenin-Thymin)-Paarung im Block-Oligomer $\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)$ widerlegt im Verein mit bereits oben erwähnten Kriterien (Schmelz-Temperatur, Hyperchromizität, CD-Spektren) die Alternativ-Hypothese, wonach das UV- und CD-spektroskopisch beobachtete Verhalten der Homo-DNS-Oligomeren des Typs $\text{ddGlc}(\text{A-T})_n$ bei gegenseitiger Strang-Verschiebung um eine Baseneinheit durch eine jeweils von einem inerten (T-T)-Paar unterbrochene Sequenz von (A-A)-Selbstpaarungen zustande kommen würde. Die Argumentation impliziert die antiparallele Orientierung der Oligonucleotid-Stränge in den Paarungskomplexen; diese wichtige Implikation ist durch die gezielten zusätzlichen Experimente gestützt, die im Kap. 2.6 besprochen werden. Thermodynamische Daten ausgewählter Oligonucleotide mit (Adenin-Thymin)- sowie (Adenin-Uracil)-Paarung werden im Kap. 2.7 behandelt.

2.3. Guanin paart mit Guanin. Das Hexamer des Homo-deoxyguanosins $\text{ddGlc}(\text{G}_6)$ weist ein phänomenologisch ähnliches Selbstpaarungsverhalten auf wie das entsprechende Hexamer des Adenins (Fig. 10). Auch hier ist das Verhalten ausgeprägt verschieden von dem des entsprechenden, natürlichen Oligonucleotids $\text{d}(\text{G}_6)$: dessen UV-Hyperchromizität (250 nm, $c = 11,2 \mu\text{M}$, $\Delta T/\text{min} = 0,5^\circ/\text{min}$) steigt ab ca. 40° wendepunktslos auf ca. 15% Hyperchromizität (bei 95°) an, bleibt bei Abkühlung jedoch vorab konstant und fällt erst ab ca. 40° mit einem Wendepunkt um 27° auf ca. 5% Hyperchromizität ab, welche dann erst nach ca. 1 h den Ausgangswert des Mess-Experiments wieder erreicht (Fig. 10d)¹⁷⁾. Demgegenüber zeigt $\text{ddGlc}(\text{G}_6)$ eine ausgeprägt sigmaoide, reversibel sich einstellende Schmelz-Kurve; sie zeigt – analog wie $\text{ddGlc}(\text{A}_6)$ – eine charakteristisch geringe Hyperchromizität und eine Schmelz-Temperatur, die vergleichbar ist mit jener von $\text{ddGlc}(\text{A}_6)$. Die Verwandtschaft zwischen $\text{ddGlc}(\text{A}_6)$ und $\text{ddGlc}(\text{G}_6)$ ist auch durch den Vergleich der CD-Spektren (Fig. 10e und 9c) augenfällig, und zwar insbesondere dann, wenn man dieselben dem CD-Spektrum eines (Purin-Pyrimidin)-Duplexes (z. B. $\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)$, Fig. 9a) gegenüberstellt.

Im Unterschied zu allen anderen (bisher untersuchten) ddGlc -Oligonucleotiden liess sich $\text{ddGlc}(\text{G}_6)$ nicht auf übliche Weise an einer Ionenaustausch-Säule bei pH 7 chromatographieren, wohl aber – wie in [26] u. a. auch für $\text{d}(\text{G}_6)$ beschrieben – bei pH 12. Auch bezüglich seines Verhaltens unter Mess-Bedingungen der NMR-Spektroskopie

¹⁶⁾ Über das Ausmass und die Begründung des 'dangling end'-Effekts vgl. [24] und die darin zitierte frühere Literatur.

¹⁷⁾ Dieses im Vergleich zu $\text{ddGlc}(\text{G}_6)$ UV-spektroskopisch viel komplexere Verhalten von $\text{d}(\text{G}_6)$ reflektiert vermutlich eine (kinetisch langsame) Bildung einer Oligo-guanosin-Tetrad, vgl. [25] (und daselbst frühere Literatur) sowie Kap. 3.2.

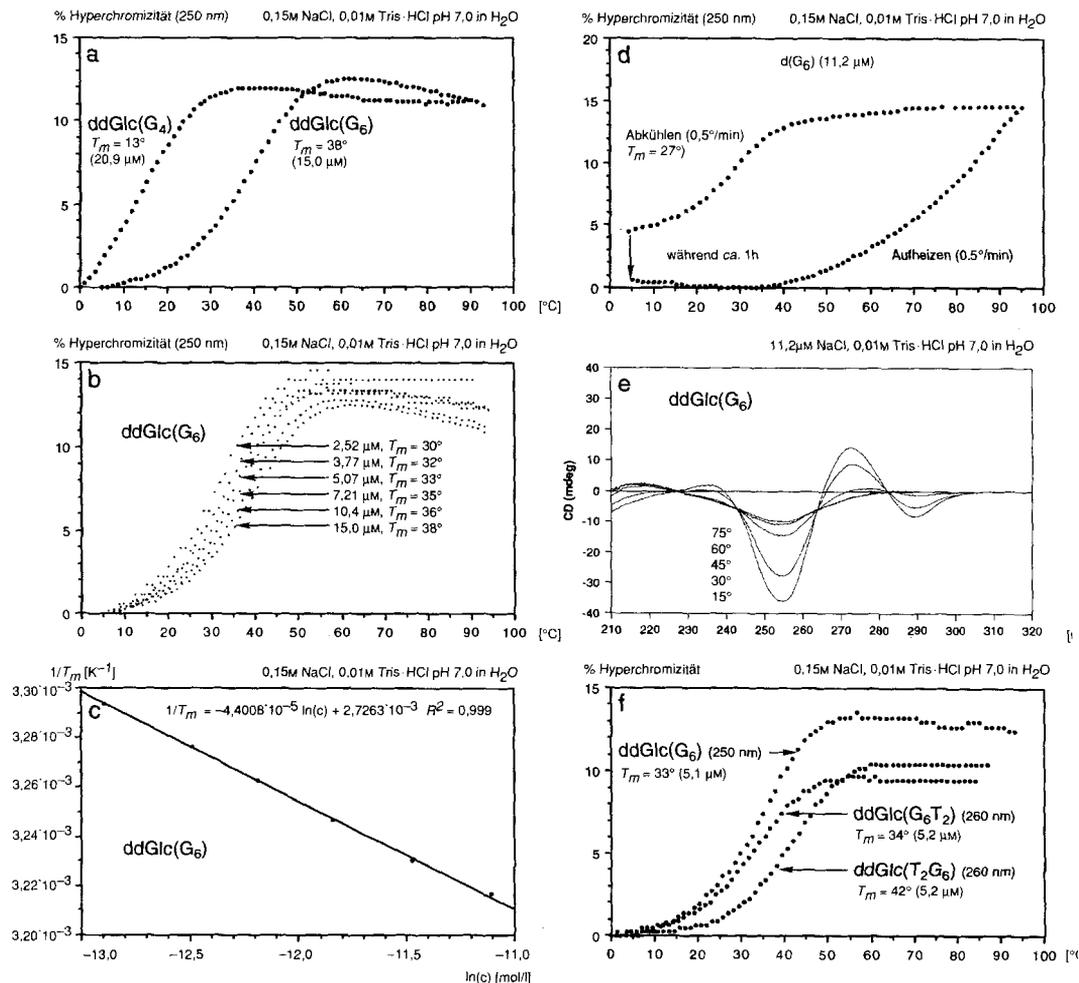


Fig. 10. Selbstpaarung von ddGlc(G_n)-Oligonucleotiden*)

*) Self-pairing of homo-deoxyguanosine oligomers is closely related to that for homo-deoxyadenosine oligomers, as shown by the UV-hyperchromicity curves of ddGlc(G₄) and ddGlc(G₆) (Fig. 10a-c) as well as by their temperature-dependent CD spectra (Fig. 10e). For comparison with the natural series, Fig. 10d shows the hyperchromicity curves of d(G₆) measured under the same conditions as for ddGlc(G₆). In contrast to the latter case, where the hyperchromicity curves observed in the heating and cooling direction ($\Delta T \approx \pm 0.5^\circ$ min) are essentially identical, the d(G₆) curve displays pronounced hysteresis, possibly due to involvement of a G tetrade. Fig. 10f illustrates the effect of dangling T-T ends at the 4'- or 6'-end of ddGlc(G₆). As is the case in the natural series [26], G-containing oligonucleotides can present problems in ion-exchange chromatography; ddGlc(G₆) can be chromatographed at pH 12, but not at pH 7, in contrast to ddGlc(G₄), ddGlc(T₂-G₆), and ddGlc(G₆-T₂).

(Kap. 3.2.2) machte ddGlc(G₆) spezifische Schwierigkeiten; so war bei der hierzu notwendigen Substratkonzentration (ca. 2 mM) unter Normalbedingungen infolge sukzessive eintretender Präzipitation des Messgutes keine zeitlich ausgedehnte NMR-Spektroskopie möglich. Das um zwei Nucleotid-Einheiten kürzere Oligomer ddGlc(G₄) (vgl. Fig. 10a) verhielt sich hingegen chromatographisch normal. Dies traf interessanterweise auch für die beiden Oligonucleotide ddGlc(G₆-T₂) und ddGlc(T₂-G₆) zu. Diese interessierten uns im Zusammenhang mit der Frage nach dem Einfluss überhängender Pyrimidine ('dangling ends') auf die Paarungsstabilität der ddGlc(G₆)-Paarungskomplexe. Dabei wurde gefunden [27], dass am 4'-Ende überhängende Thymin-Reste auf die Stabilität von (G-G)-Paarungskomplexen praktisch keinen Einfluss haben (ddGlc(G₆-T₂) schmilzt gleich wie ddGlc(G₆)), während zwei überhängende Thymin-Reste am 6'-Ende von ddGlc(G₆) die Stabilität deutlich erhöhen (vgl. Fig. 10f). Unterschiede solcher Art im Einfluss von 'dangling ends' auf die Duplex-Stabilität sind bei d-Oligonucleotiden bekannt¹⁶).

Die Reihe der bezüglich einer alternierenden (G-T)-Paarung antiparallel selbstkomplementären Homo-DNS-Oligonucleotide ddGlc((T-G)_n) (n = 3–5) zeigte UV-spektroskopisch keinerlei Anzeichen einer Komplexierung [6]. Demnach scheint in dieser Reihe weder eine (G-T)-Paarung noch eine unter gegenseitiger Strang-Verschiebung mögliche, mit inerten (T-T)-Paaren intermittierende (G-G)-Paarung aufzutreten. Weitere experimentelle Befunde zur (G-G)-Paarung sind in Kap. 2.6 und 2.7 erörtert.

2.4. Guanin paart mit Cytosin (und zwar stärker als mit sich selbst). Die (G-G)-Paarung im Selbstpaarungskomplex von ddGlc(G₆) wird durch ddGlc(C₆) gebrochen und durch die thermodynamisch stabilere (G-C)-Paarung ersetzt. Der Selbstpaarungskomplex wird bei Zugabe von 1 mol-equiv. des ddGlc(C₆)-Einzelstrangs in den um ca. 20° höher schmelzenden (1:1)-Mischpaarungskomplex ddGlc(G₆)/ddGlc(C₆) umgewandelt, wie aus den in Fig. 11 ersichtlichen Beobachtungen hervorgeht. Am Vergleich der Schmelz-Kurven des Selbstpaarungskomplexes von ddGlc(G₆) und des Mischpaarungskomplexes ddGlc(G₆)/ddGlc(C₆) (Fig. 11a) fällt vor allem auch der Unterschied in den Hyperchromizitätsbereichen auf; ein solcher ist in der Homo-DNS-Reihe für den Übergang von (Purin-Purin)-Paarungen zwischen identischen Purinen und (Purin-Pyrimidin)-Paarungen charakteristisch. Die (1:1)-Stöchiometrie der Umwandlung des ddGlc(G₆)-Selbstpaarungskomplexes in den (ddGlc(G₆)/ddGlc(C₆))-Mischpaarungskomplex ist durch das in Fig. 11b illustrierte Ergebnis des Titrationsexperiments belegt, in welchem die UV-Absorption bei 280 nm von Mess-Lösungen konstanten Gesamtnucleotid-Gehalts, jedoch zwischen 0% und 100% komplementär sich ändernden Gehalts an ddGlc(G₆) und ddGlc(C₆) ermittelt wurde. Die Lage des Schnittpunkts der beiden (approximierten) Mess-Geraden zeigt, dass unter den verwendeten Bedingungen (0,15M NaCl, pH 7,0) sich ein Duplex (oder gegebenenfalls Tetraplex), jedoch kein (UV-spektroskopisch erfassbarer) Triplex bildet¹⁸). Das temperatur-abhängige CD-Spektrum des (ddGlc(G₆)/ddGlc(C₆))-Mischpaarungskomplexes (Fig. 11c) zeigt den typischen Habitus eines (Purin-Pyrimidin)-Paarungskomplexes, wie ein Vergleich mit den CD-Spektren der Fig. 8–10 belegt.

Während die Selbstpaarung von Homo-DNS-(Purin-Purin)-Oligonucleotiden gelelektrophoretisch höchstens indirekt nachweisbar ist, lässt sich die Umwandlung des

¹⁸) Ein orientierender Versuch mit ddGlc(G₆) und ddGlc(C₆) in Gegenwart von 0,15M MgCl₂ gab einen Hinweis auf die Bildung nicht eines Triplexes, sondern eines Tetraplexes mit G/C 3:1, vgl. [6], S. 179.

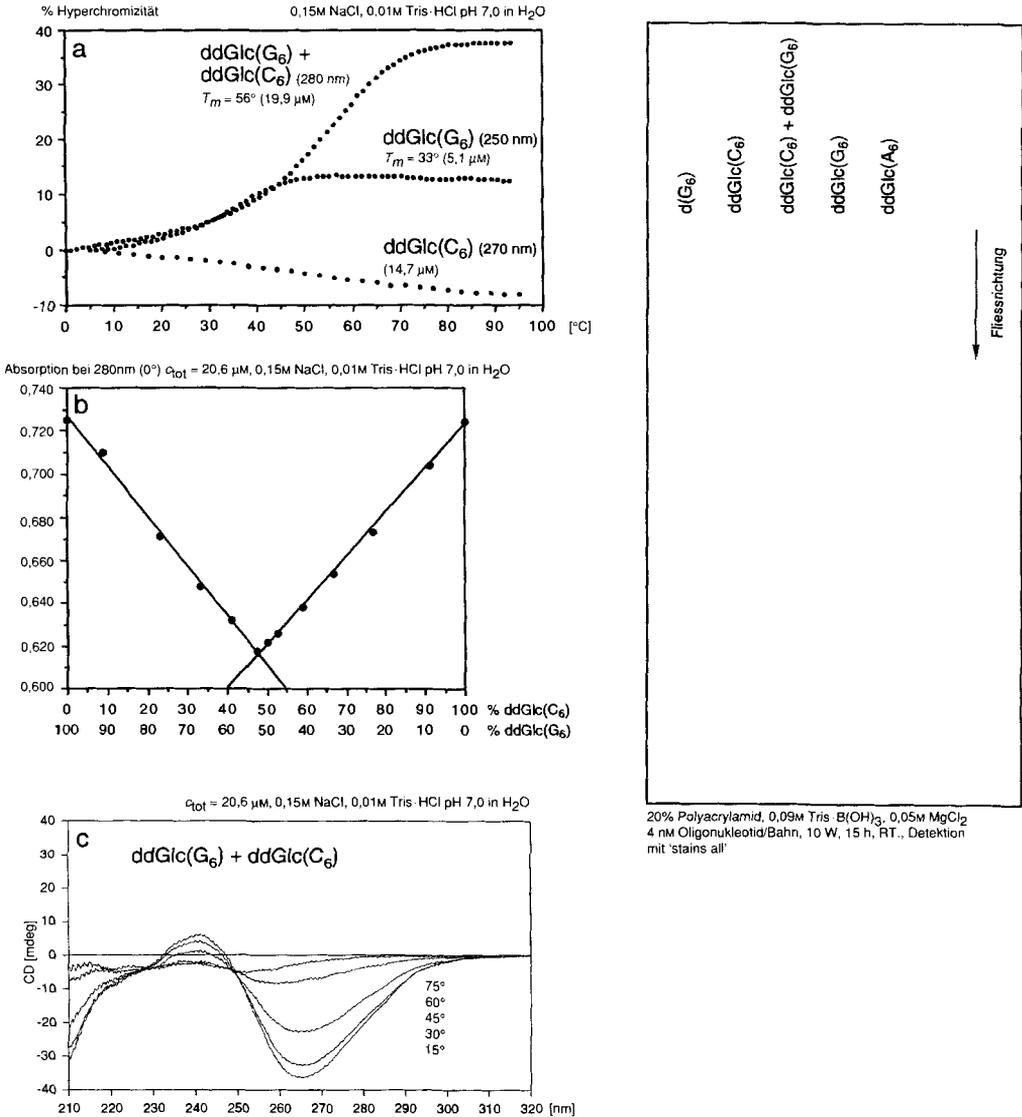


Fig. 11. Mischpaarung von ddGlc(G₆) mit ddGlc(C₆)*

*) The self-pairing of ddGlc(G₆) is broken, when 1 mol-equiv. of (single-stranded) ddGlc(C₆) is added, according to UV-hyperchromicity curves (Fig. 11a), ratio-dependent UV absorption (280 nm, 0°) of ddGlc(G₆)/ddGlc(C₆) mixtures (Fig. 11b), temperature-dependent CD spectra (Fig. 11c), and gel electrophoresis under non-denaturing conditions (Fig. 11d). The resulting 1:1 complex (Fig. 11b) shows a CD spectrum which recalls, for example, that of ddGlc(A₅-T₅) (Fig. 8). On gel electrophoresis, both (single-stranded) ddGlc(C₆) and (self-paired) ddGlc(G₆) run distinctly differently from their 1:1 mixture, the ddGlc(G₆) spot being smeared, but much less so than the corresponding spot of d(G₆) which runs hardly at all under the conditions used. The self-complementary oligomers ddGlc((C-G)₃) (T_m = 62°) and ddGlc(((G-C)₃) (T_m = 64°) have melting temperatures similar to that of the 1:1 complex ddGlc(G₆)/ddGlc(C₆) (T_m = 61°, c ≈ 50 μM), and also similar CD spectra [6].

(Purin-Purin)-Selbstpaarungskomplexes ddGlc(G₆) in den (Purin-Pyrimidin)-Mischpaarungskomplex ddGlc(G₆)/ddGlc(C₆) durch Gel-Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen direkt sichtbar machen (Fig. 11). Unter den in solchen Experimenten verwendeten (im Vergleich zu den UV-spektroskopischen Messungen, höheren) Substrat- und Salz-Konzentrationen (vgl. *Exper. Teil*) wandert der Selbstpaarungskomplex von ddGlc(G₆) (im Unterschied zu jenem von ddGlc(A₆), vgl. auch Fig. 6 nebst Fig. 11) nicht als einheitlicher, sondern als verschmierender Fleck¹⁹⁾; ddGlc(C₆) wandert weit und als scharf umgrenzter Fleck. Das zum Vergleich geprüfte Hexamere der natürlichen Reihe d(G₆) wandert unter den Versuchsbedingungen kaum, d. h. es zeigt lediglich einen verschmierten Startfleck. Der (ddGlc(G₆)/ddGlc(C₆))-(1:1)-Mischkomplex wandert in einer Laufposition, die zwischen den Positionen der Selbstpaarungskomplexe von ddGlc(G₆) und ddGlc(A₆) liegt (der Schweif des an sich scharfen Flecks dürfte auf eine geringe Überschuss-Menge an ddGlc(G₆) zurückzuführen sein).

Sämtliche an ddGlc(C₆) gemachten Beobachtungen (UV- und CD-Spektroskopie, gel-elektrophoretisches Verhalten, Fig. 11) weisen darauf hin, dass dieses Pyrimidin-Oligomer ebenso wie ddGlc(T₆) (Fig. 4a und 6) unter normalen Beobachtungsbedingungen als Einzelstrang vorliegt. Die Pyrimidin-Oligomere der Homo-DNS-Reihe unterscheiden sich hierin nicht von jenen der DNS-Reihe.

Die Hexameren ddGlc((C-G)₃) und ddGlc((G-C)₃) verhalten sich beide als *selbstkomplementäre* Oligonucleotide, indem sie Paarungskomplexe bilden, die vergleichbar hochschmelzen wie der (1:1)-Mischpaarungskomplex von ddGlc(G₆)/ddGlc(C₆) (62°, 64° und 61° bei $c \approx 50 \mu\text{M}$). Die temperatur-abhängigen CD-Spektren der beiden Komplexe sind unter sich sehr ähnlich und vom gleichen Typus wie die CD-Spektren des Mischpaarungskomplexes ddGlc(G₆)/ddGlc(C₆) (vgl. Daten in [6], S. 177).

2.5. Auch Adenin scheint mit Cytosin zu paaren (dann aber schwächer als mit Thymin).

Die Prüfung des UV-spektroskopischen Verhaltens von ddGlc((A-C)_n)-Oligonucleotiden mit $n = 3-6$ hat die Tatsache aufgedeckt, dass diese in der Homo-DNS-Reihe ab einer genügend grossen Kettenlänge ($n > 4$) Paarungskomplexe bilden (Fig. 12a). Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu jenem entsprechende Oligonucleotide der DNS-Reihe, wie Fig. 12d im Vergleich zur Fig. 12a zeigt. Die Schmelz-Temperaturen der ddGlc((A-C)_n)-Paarungskomplexe liegen (auf gleiche Konzentrationen bezogen) generell rund 20–30° tiefer als die der entsprechenden ddGlc((A-T)_n)-Komplexe, aber immerhin noch etwas höher als jene der d((A-T)_n)-Oligomere in der natürlichen Reihe²⁰⁾. Für den Fall von ddGlc((A-C)₆) wurde nachgewiesen, dass die charakteristische sigmaoide Schmelz-Kurve einen *intermolekularen* Paarungsprozess widerspiegelt: die Schmelz-Temperaturen sind – wie es für einen *intermolekularen*, nicht aber *intramolekularen* Vorgang zu fordern ist – im erwarteten Sinne konzentrationsabhängig (Fig. 12b und c). Auch sein CD-Spektrum (Fig. 12e) belegt durch seine Temperatur-Abhängigkeit den Paarungsprozess. Ein in jeder Beziehung analoges Verhalten wurde in der invers-isomeren Reihe der ddGlc((C-A)_n)-Oligonucleotide ($n = 3-6$) beobachtet (Einzelheiten vgl. [7]).

¹⁹⁾ Vgl. in diesem Zusammenhang das Verhalten von ddGlc(G₆) bei HPLC (vgl. oben) sowie unter den Messbedingungen der NMR-Spektroskopie (Kap. 3.2.2).

²⁰⁾ So z. B. schmilzt d((A-T)₆) bei 24° bei $c = 8,9 \mu\text{M}$ unter sonst gleichen Bedingungen; vgl. auch Fig. 7; die Konzentrationen sind dort jedoch höher.

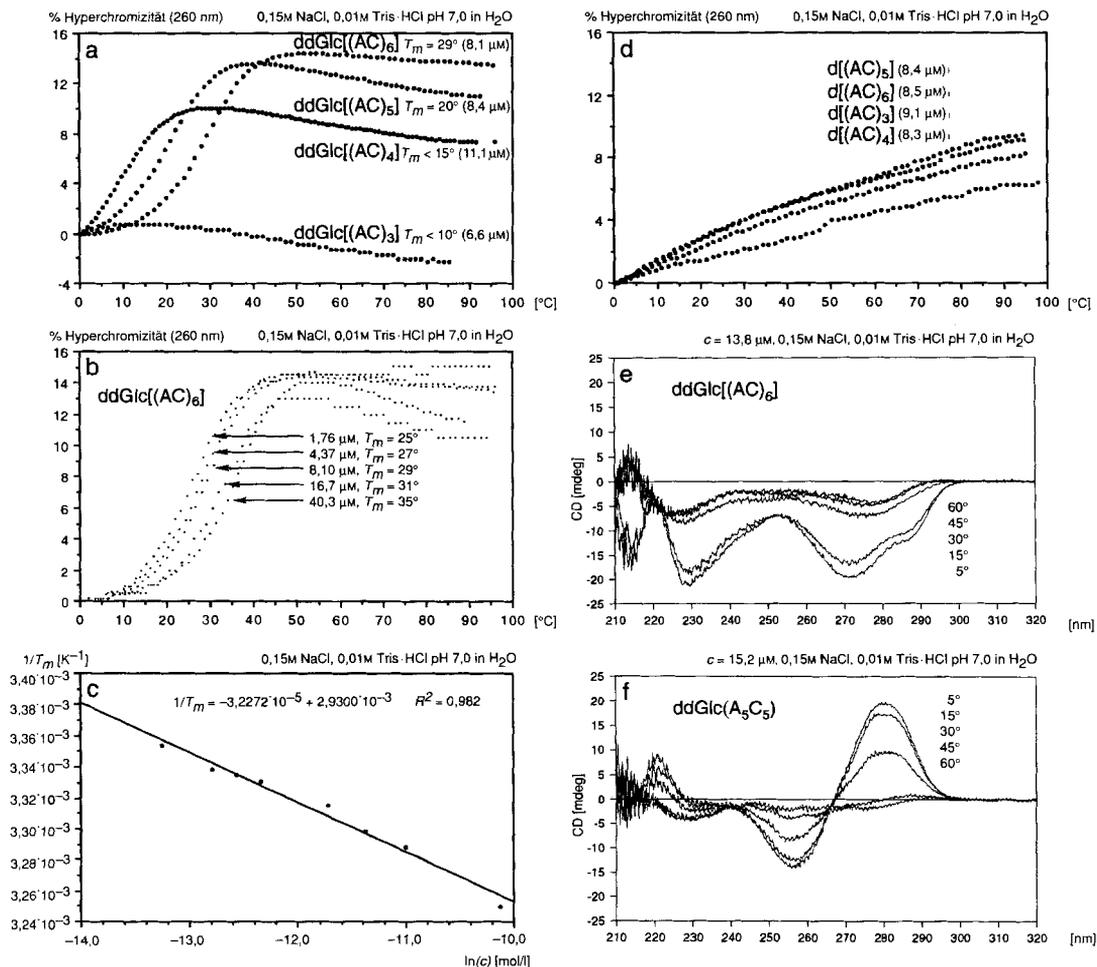


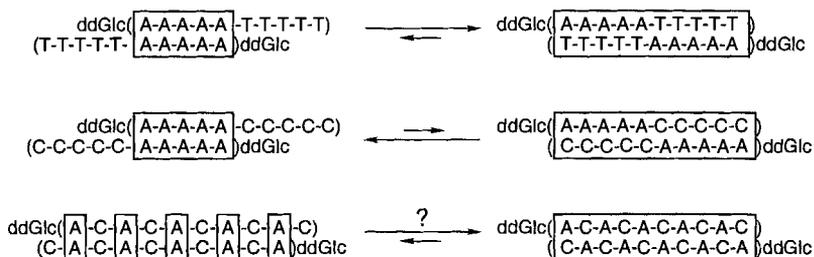
Fig. 12. Selbstpaarung von ddGlc((A-C)_n)-Oligonucleotiden*)

*) ddGlc((A-C)_n) oligomers ($n > 3$) show clean-cut pairing, according to temperature-dependent UV (Fig. 12a-c) and CD spectroscopy (Fig. 12e), in sharp contrast to the corresponding oligomers in the natural series (Fig. 12d). According to T_m values, the pairing of ddGlc((A-C)₍₄₋₆₎) oligomers, is distinctly weaker than that of corresponding ddGlc((A-T)₍₄₋₆₎) oligomers, whereas their CD spectra are of similar type. However, the CD spectra of ddGlc(A₅C₅) are reminiscent of those of ddGlc(A₆) (adenine-adenine pairing, Fig. 1d), whereas the spectra of ddGlc(A₅T₅) resemble those of ddGlc((A-T)₅) (A-T pairing, Fig. 8). Scheme 2 gives an interpretation of these observations, considering the existence of a specific A-C pairing as very probable, but the (formally possible) alternative of interrupted A-A pairing in ddGlc((A-C)₍₄₋₆₎) oligomers as not rigorously excluded.

Der Typus des CD-Spektrums des Paarungskomplexes von $ddGlc((A-C)_6)$ ist ähnlich jenem des CD-Spektrums von $ddGlc((A-T)_5)$ (Fig. 8), aber klar verschieden vom Typ des CD-Spektrums z. B. des $ddGlc(A_{10})$ -Selbstpaarungskomplexes (Fig. 8). Umgekehrt ist aber das CD-Spektrum des bei 35° ($c = 7 \mu M$) schmelzenden Block-Oligomers $ddGlc(A_5-C_5)$ nicht dem Spektrum des entsprechenden Block-Oligomers $ddGlc(A_5-T_5)$, sondern jenem des Selbstpaarungskomplexes von $ddGlc(A_{10})$ (Fig. 8) ähnlich. Hieraus darf gefolgert werden, dass im Unterschied zu $ddGlc(A_5-T_5)$ im Block-Oligomer $ddGlc(A_5-C_5)$ die Komplexierung durch eine (A-A)-Selbstpaarung, und nicht durch eine (Purin-Pyrimidin)-Paarung zustande kommt. Analoges gilt für $ddGlc(A_4-C_4)$ ($T_m = 16^\circ$, $c = 10 \mu M$, vgl. [7]).

Beim Selbstpaarungskomplex mit *alternierender* (Adenin-Cytosin)-Sequenz $ddGlc((A-C)_5)$ könnte es sich auf Grund des CD-Spektrums sehr wohl um eine spezifische (A-C)-Paarung handeln. Da diese schwächer zu sein hätte als die (A-T)-Paarung (vgl. Schmelz-Temperaturen, Fig. 12a), wäre das Umkippen in die (A-A)-Paarung im Komplex des isomeren Block-Oligomers $ddGlc(A_5-C_5)$ plausibel (Schema 2). Die Alternative einer intermittierenden (A-A)-Paarung mit Strang-Verschiebung in $ddGlc((A-C)_5)$ und analogen Oligomeren $ddGlc((A-C)_n)$ kann allerdings nicht eigentlich ausgeschlossen werden; indessen betrachten wir eine solche, von einem neutralen (Pyrimidin-Pyrimidin)-Paar unterbrochene (Purin-Purin)-Paarung aus zwei Gründen als eher unwahrscheinlich: erstens weil eine analoge Paarung in der Reihe $ddGlc((T-G)_n)$ ($n = 3-5$) UV-spektroskopisch nicht beobachtet wird (vgl. Kap. 2.3), obwohl sich dort eine konstitutionell und energetisch analoge Gelegenheit dazu böte, und zweitens weil der z. B. von $ddGlc((A-C)_6)$ gezeigte Betrag an Duplexierungsenthalpie (vgl. Tab. 1, Nr. 9), der sich in der (A-A)-Paarungsversion im wesentlichen auf sechs (A-A)-Paarungen beziehen müsste, sich mit der für $ddGlc(A_6)$ ermittelten Duplexierungsenthalpie (vgl. Tab. 1, Nr. 11) schwerlich vertragen würde.

Schema 2. Vergleich der Selbstpaarung von $ddGlc(A_5-T_5)$ und von $ddGlc(A_5-C_5)$ *)



*) See comments to Fig. 12.

Fig. 13 zeigt noch das Ergebnis eines Experiments, das nach Kenntnis der Eigenschaften von (A-C)-Sequenzen in der Homo-DNS-Reihe im Hinblick auf die Frage nach einem chemischen Nachweis der Strang-Orientierung bei der (A-A)-Selbstpaarung durchgeführt worden ist. Im Rückblick steht das Ergebnis als ergänzende Illustration der Antiparallelität der (A-A)-Paarung, wie sie aus den später durchgeführten Experimenten mit (A-G)-Sequenzen mit einem höheren Grad an Verlässlichkeit gefolgert werden konnte

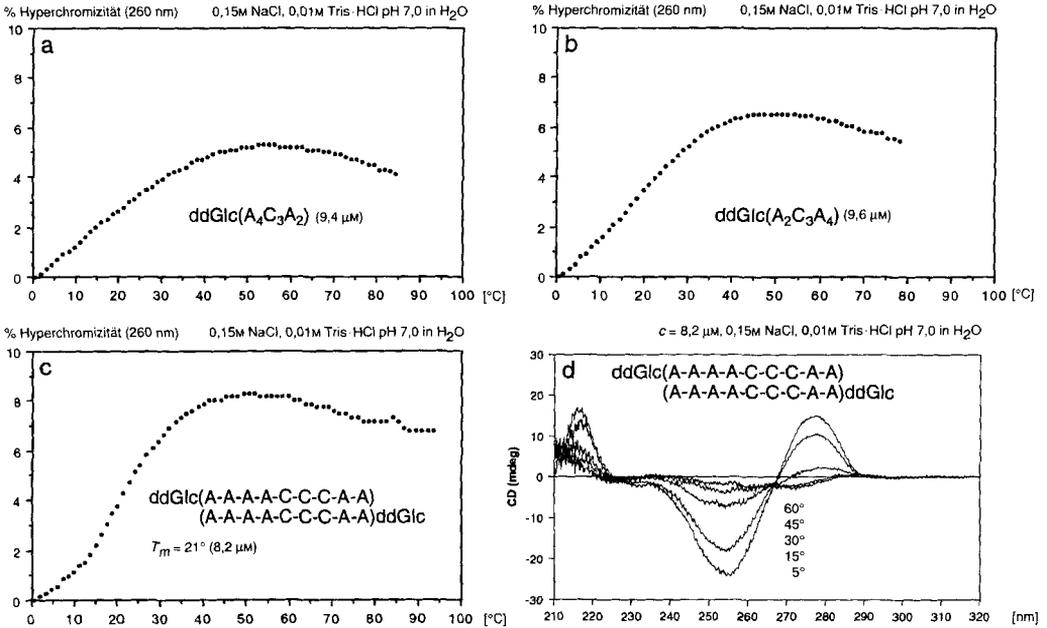


Fig. 13. Experiment zur Frage der Strang-Orientierung in (A-A)-gepaarten ddGlc-Oligonucleotiden*)

*) This experiment anticipates other (and more significant) experiments discussed below, demonstrating strand orientation in A-A pairing. The complex formed upon mixing equimolar amounts of ddGlc(A₄-C₃-A₂) and ddGlc(A₂-C₃-A₄) is – according to T_m values – more stable than the self-paired complexes of the two components. Since the former (as well as the latter [7]) have CD spectra characteristic of A-A-paired complexes (Fig. 13d), the higher stability of the former points to antiparallel strand orientation in A-A pairing; the stability relationship could be expected to be reversed, were A-A pairing to prefer parallel strand orientation.

(vgl. Kap. 2.6). Die Selbstpaarungskomplexe²¹⁾ der beiden Komponenten (Fig. 13a und b) sind instabiler als der (1:1)-Mischpaarungskomplex (Fig. 13c), dessen CD-Spektrum (Fig. 13d) ihm eindeutig den Konstitutionstyp der (A-A)-Paarung von ddGlc(A_n)-Selbstpaarungskomplexen zuweist. Würde die (A-A)-Paarung parallele Strang-Orientierung bevorzugen, hätte das Umgekehrte beobachtet werden müssen (vgl. die Erörterungen im Kap. 2.6).

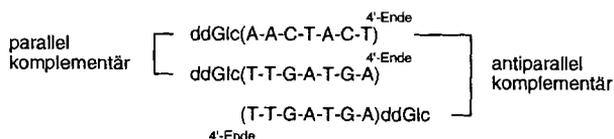
2.6. Sowohl (Purin-Pyrimidin)- als auch (Purin-Purin)-Paarungen bevorzugen antiparallele Strang-Orientierung. Die gegenläufige Anordnung der Rückgrat-Ketten ist bei Oligonucleotid-Duplexen der natürlichen Reihe die Norm. Dass indessen eine Parallel-Paarung durchaus existiert, wenn die Komplementarität der Basensequenzen sich spezifisch auf eine *parallele* und nicht auf eine *antiparallele* Anordnung der Rückgrat-Ketten bezieht, ist in letzter Zeit an verschiedenen Beispielen gezeigt worden [28]. Wir haben die

²¹⁾ Dass solche Komplexe unter den Mess-Bedingungen vorliegen, zeigen die CD-Spektren (vgl. Abbildungen in [7]), welche den CD-Spektren von ddGlc(A_n)-Selbstpaarungs-Komplexen ähnlich sind.

Antiparallelität der Basenpaarung in Homo-DNS-Oligonucleotiden nicht einfach aus Analogiegründen vorausgesetzt, sondern durch speziell entworfene Paarungsexperimente mit spezifisch antiparallel vs. parallel komplementären Basensequenzen experimentell nachgeprüft. Für die bislang besprochenen (Purin-Pyrimidin)-Paarungen des Typs $\text{ddGlc}((\text{Purin} \cdot \text{Pyrimidin})_n)$ und $\text{ddGlc}((\text{Purin})_n \cdot (\text{Pyrimidin})_n)$ weist zwar die beobachtete Selbstkomplementarität der Sequenzen mit Nachdruck auf den antiparallelen Paarungsmodus hin, doch könnten – wenigstens grundsätzlich – auch Parallel-Paarungen für zumindest einen Teil der Beobachtungen stehen²²⁾. Für die bislang besprochenen Fälle von (Purin-Purin)-Paarungen hingegen geben die bisherigen experimentellen Beobachtungen (von der Vorwegnahme jener in Fig. 13 abgesehen) bezüglich der Strang-Orientierung antiparallel vs. parallel keine Auskunft.

Schema 3 illustriert das Konzept und Fig. 14 die Ergebnisse eines Experiments, dessen Zielsetzung die Entscheidung darüber ermöglicht, ob in der Homo-DNS-Reihe eine aus den vier natürlichen Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin bestehende Basensequenz für die (Purin-Pyrimidin)-Paarung die antiparallel-komplementäre oder die parallel-komplementäre Partner-Sequenz vorzieht. Zu diesem Zweck wird das Oligonucleotid mit der weder antiparallel- noch parallel-selbstkomplementären Sequenz $\text{ddGlc}(\text{A-A-C-T-A-C-T})$ in einem der Experimente mit dem Partner-Oligonucleotid $\text{ddGlc}(\text{T-T-G-A-T-G-A})$ mit parallel-komplementärer Basensequenz hybridisiert und in einem zweiten Experiment mit dem Partner $\text{ddGlc}(\text{A-G-T-A-G-T-T})$, dessen Basensequenz antiparallel-komplementär zur ersten Sequenz ist²³⁾. Der Vergleich der UV-spektroskopisch ermittelten Schmelz-Kurven (Fig. 14a) zeigt völlig eindeutig die Bevorzugung der antiparallelen Strang-Orientierung (T_m des antiparallelen Duplexes 42° vs. ca. 10° beim Alternativ-Experiment, vgl. auch Fussnote 23). Gleiches bezeugt ein Gel-Elektrophorese-Experiment (Fig. 14b): das (1:1)-Gemisch der zwei Oligonucleotide mit parallel-komplementärer Basensequenz zeigt identisches Laufverhalten wie die beiden Komponenten, während das

Schema 3. Experiment zur Frage der Strang-Orientierung in (A-T)- und (G-C)-gepaarten *ddGlc*-Oligonucleotiden*)



*) The sequences of three *ddGlc* oligomers which are not self-complementary, but mutually complementary with respect to purine-pyrimidine pairing, depending on whether the strand orientation is antiparallel or parallel. Relative stabilities of corresponding 1:1 complexes are expected to demonstrate whether purine-pyrimidine pairing in the homo-DNA series prefers antiparallel or parallel strand orientation.

²²⁾ So z. B. könnten Basensequenzen des Typs $\text{ddGlc}((\text{A-T})_n)$ dadurch parallel paaren, dass nach gegenseitiger Strang-Verschiebung um eine Mononucleotid-Einheit anstelle von $2n$ antiparallel angeordneten Paarungen $(2n - 1)$ parallel angeordnete (A-T)-Paarungen mit einem überhängenden A-Mononucleotid am 6'-Ende und einem überhängenden T-Nucleotid am 4'-Ende vorliegen würden. Die in Fig. 9 illustrierten UV- und CD-Spektren von $\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{T}_5)$ und $\text{ddGlc}(\text{A}_6\text{T}_4)$ sind indessen mit einer parallelen Strang-Orientierung der (A-T)-Paarung nicht vereinbar, lassen aber diese Frage bezüglich der (A-A)-Paarung offen.

²³⁾ Die beiden Guanin-haltigen Partner-Nucleotide sind zwar formal nicht-selbstkomplementär, zeigen jedoch schwache Selbstpaarung mit T_m -Werten von weniger als 20° ($c \approx 10 \mu\text{M}$).

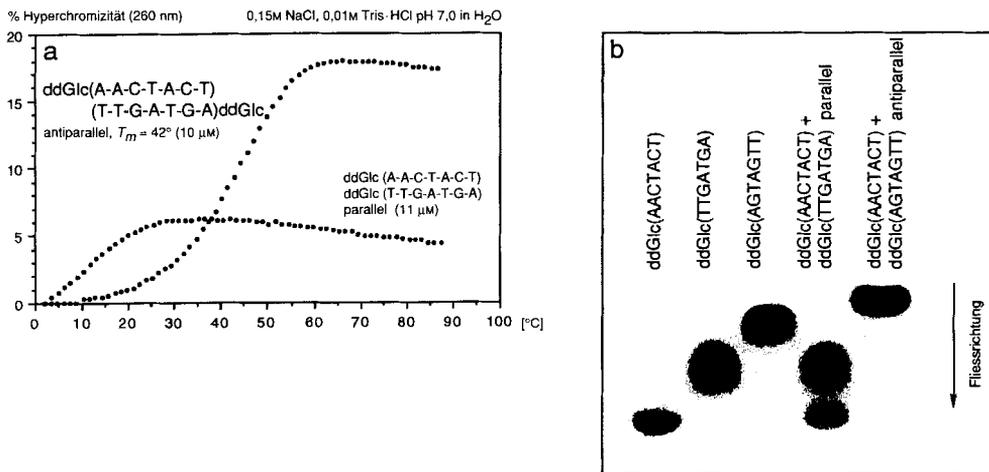


Fig. 14. Experiment zur Frage der Strang-Orientierung in (A/T)- und (G/C)-gepaarten ddGlc-Oligonucleotiden*)

20% Polyacrylamid, 0,09M Tris·B(OH)₃, 0,05M MgCl₂
4 nM Oligonucleotid/Bahn, 10 W, 15 h, RT, Detektion mit 'stains all'

- *) Both the T_m values from UV-hyperchromicity curves and the gel-electrophoretic behavior under non-denaturing conditions, of the two complexes formed upon mixing equimolar amounts of the ddGlc oligomers presented in Scheme 3, demonstrate that antiparallel strand orientation is preferred for purine-pyrimidine pairing in the homo-DNA series. The partners of these two 1:1 complexes themselves show self-pairing to a degree (cf. [7]) that corresponds to T_m values of less than 20° ($c \approx 10 \mu$ M). An analogous strand orientation test, with the same result, has been carried out with ddGlc(T-A-A-A-T-A-T-T) and the two corresponding partner sequences (cf. [4]).

(1:1)-Gemisch der Oligonucleotide mit antiparallel-komplementärer Basensequenz offenbar als eine neue Spezies (Duplex) läuft, indem es einen im wesentlichen einzigen Lauffleck zeigt²⁴⁾, der in seiner Position mit keinem der Flecken der individuellen Oligonucleotid-Partner identisch ist.

Ein solcher spezifischer Nachweis der Antiparallelität der (Purin-Pyrimidin)-Paarung war vorgängig für die (Adenin-Thymin)-Sequenz ddGlc(T-A-A-A-T-A-T-T) durchgeführt worden. Infolge der Eigenschmelzpunkte der drei zugehörigen Partnersequenzen (Einzelheiten vgl. [4] S. 100–110) war der UV-spektroskopische Nachweis der Paarungsantiparallelität in dieser Reihe weniger augenfällig, um so mehr jedoch der Gel-Elektrophorese-Test, bei welchem das (1:1)-Gemisch der antiparallel-komplementären Oligonucleotide ddGlc(T-A-A-A-T-A-T-T) und ddGlc(A-A-T-A-T-T-A) als ein durch sein Laufverhalten sehr deutlich erkennbarer Duplex wanderte, während das (1:1)-Gemisch von ddGlc(T-A-A-A-T-A-T-T) und der parallel-komplementären Sequenz ddGlc(A-T-T-A-T-A-A) sich zweifleckig als Gemisch der Individual-Oligonucleotide verhielt (vgl. Abbildungen in [4]).

Die beiden (Purin-Purin)-Paarungen Adenin-Adenin und Guanin-Guanin verlangen ebenfalls eine antiparallele Strang-Orientierung. Wir schliessen dies aus der Gesamtheit unserer Beobachtungen über das Paarungsverhalten von rein purinischen (Adenin-Guanin)-Sequenzen, die wir einerseits zur Abklärung der Frage nach der stereochemischen

²⁴⁾ Der schwache Nebenfleck entspricht in seiner Position dem Lauffleck von (T-T-G-A-T-G-A)ddGlc, das im (1:1)-Gemisch des Experiments offenbar in geringem Überschuss anwesend war.

Kompatibilität der beiden Homopurin-Paarungen und andererseits im Hinblick auf die Frage nach der Beobachtbarkeit einer gemischten (A-G)-Paarung gezielt hergestellt haben. Die beiden Homopurin-Paarungen erwiesen sich in der Tat als stereochemisch kompatibel, d. h. innerhalb eines Oligonucleotid-Stranges ohne erkennbaren Unterschied der Paarungsqualität miteinander kombinierbar. Bei diesen Versuchen haben wir keinen authentifizierten Fall einer Heteropurin-Paarung Adenin-Guanin angetroffen; falls eine solche überhaupt in bislang untersuchten Paarungsbeispielen auftritt (und nicht durch alternativ mögliche Homopurin-Paarungen simuliert wird), muss sie jedenfalls deutlich schwächer sein als die beiden Homopurin-Paarungen. Die hier zugehörigen Experimente sind die folgenden.

Unter Bedingungen, da die Selbstpaarungskomplexe der homopurinischen Hexameren $ddGlc(A_6)$ und $ddGlc(G_6)$ hohe Schmelz-Temperaturen von (z. T. über) 40° aufweisen, zeigen die beiden gemischt-purinischen Block-Oligomeren $ddGlc(A_3-G_3)$ und $ddGlc(G_3-A_3)$ Schmelz-Kurven, deren zugehörige Schmelz-Temperaturen in beiden Fällen sehr tief,

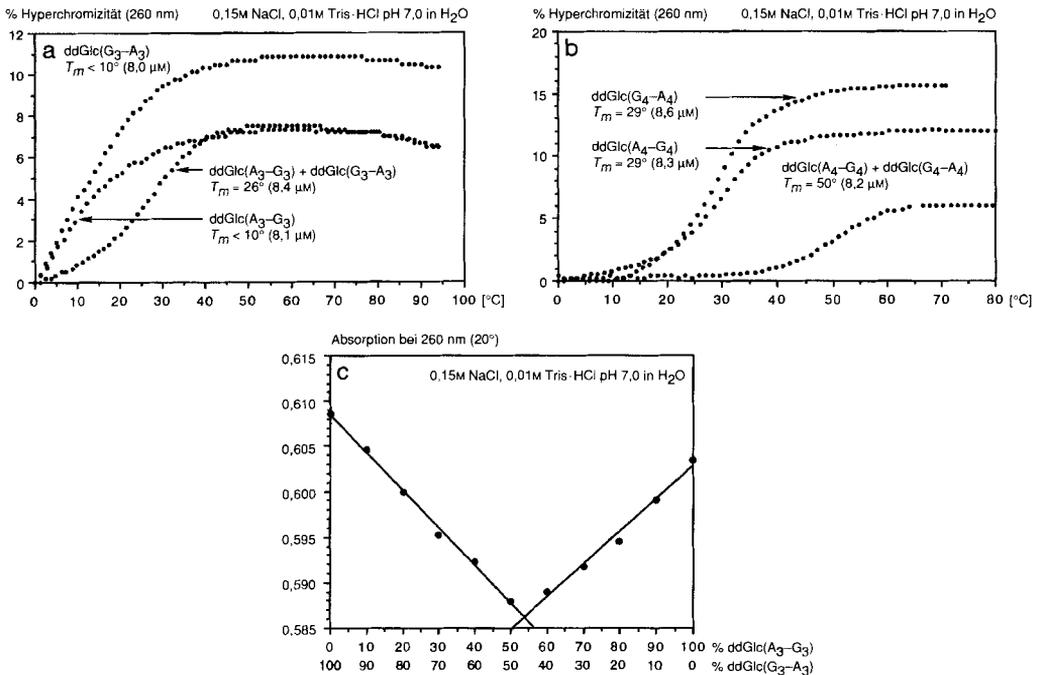


Fig. 15. Mischung von $ddGlc(G_n-A_m)$ und $ddGlc(A_m-G_n)$ -Oligonucleotiden*)

*) $ddGlc(G_3-A_3)$ and $ddGlc(A_3-G_3)$ together form a 1:1 complex (Fig. 15c) which is more stable than the self-pairing complexes of both hexamers (Fig. 15a). The corresponding two octamers $ddGlc(G_4-A_4)$ and $ddGlc(A_4-G_4)$ show analogous behavior (Fig. 15b). That the hyperchromicity curves of the latter two oligomers ($T_m = 29^\circ$) are due to intermolecular complexation has been checked by the concentration dependence of their T_m values [6]. The CD spectra reproduced in Fig. 16 indicate that all complexation involved is based on purine-purine pairing. The gel-electrophoretic behavior of these complexes (Fig. 17) corroborates the conclusions drawn.

d. h. im Bereich oberhalb 0° und unterhalb 15° liegen. Demgegenüber schmilzt das (1:1)-Gemisch der beiden Hexameren unter sonst gleichen Bedingungen ($c = 8,4 \mu\text{M}$) bei 26° (Fig. 15a). Analoges Verhalten zeigen die beiden entsprechenden Octameren $\text{ddGlc}(A_4-G_4)$ und $\text{ddGlc}(G_4-A_4)$; bei ihnen liegen beide Individual-Schmelztemperaturen bei 29° und die Schmelz-Temperatur des (1:1)-Gemisches bei 50° (Fig. 15b). Dass bei den beiden bei 29° schmelzenden Komplexen es sich um *intermolekulare* Selbstpaarungen handelt, wurde durch Nachweis der Konzentrationsabhängigkeit der Schmelz-Temperatur überprüft [6]. Für die Mischkomplexierung $\text{ddGlc}(A_3-G_3)/\text{ddGlc}(G_3-A_3)$ ist die (1:1)-Stöchiometrie durch Verfolgung des Verlaufs der UV-Absorption der Gemische bei 260 nm/20° (Gesamtkonzentration der Hexameren $8 \mu\text{M}$) in Abhängigkeit zur Gemisch-Zusammensetzung nachgewiesen (Fig. 15c). Die temperatur-abhängigen CD-Spektren (Fig. 16) glei-

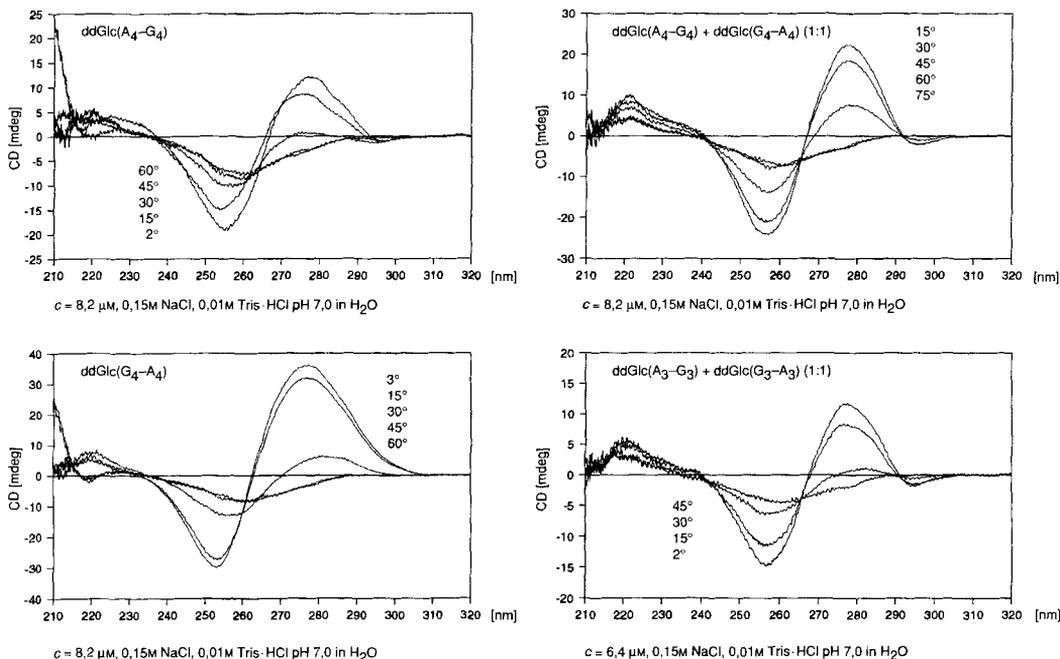


Fig. 16. Temperatur-abhängige CD-Spektren der Selbst- und Mischpaarungskomplexe von $\text{ddGlc}(G_n-A_m)$ - und $\text{ddGlc}(A_m-G_n)$ -Oligonucleotide*)

*) See comments to Fig. 15.

chen in ihrer Struktur in beiden Versuchsreihen den CD-Spektren der homopurinischen Selbstpaarungskomplexe von $\text{ddGlc}(A_6)$ (Fig. 1d) und $\text{ddGlc}(G_6)$ (Fig. 10e), und zwar gilt dies sowohl für die Selbstpaarungskomplexe von $\text{ddGlc}(A_n-G_n)$ und $\text{ddGlc}(G_n-A_n)$ ($n = 3$ und 4) als auch für deren Mischpaarungskomplexe $\text{ddGlc}(A_n-G_n)/\text{ddGlc}(G_n-A_n)$ (1:1). Schliesslich wird die Bildung anscheinend einheitlicher Mischpaarungskomplexe in beiden Versuchsreihen auch durch die in Fig. 17 reproduzierten Gel-Elektrophorese-Diagramme augenfällig demonstriert.

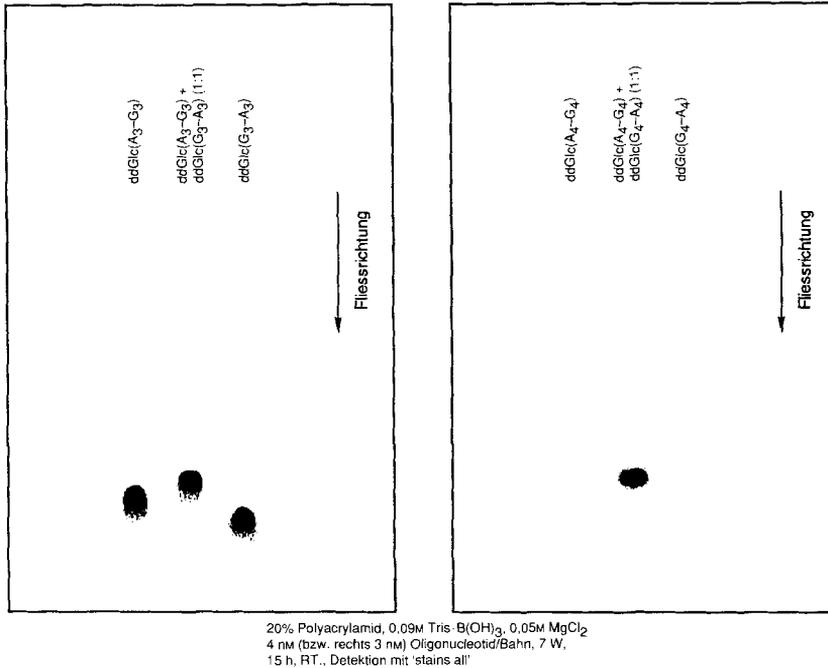


Fig. 17. Gel-elektrophoretisches Verhalten der Selbst- und Mischpaarungskomplexe von $ddGlc(G_n-A_m)$ - und $ddGlc(A_m-G_n)$ -Oligonucleotide*)

*) See comments to Fig. 15.

Sind in der Reihe der $ddGlc(A_n-G_n)$ - und $ddGlc(G_n-A_n)$ -Oligomeren die Mischpaarungskomplexe eindeutig stabiler als die entsprechenden Selbstpaarungskomplexe der individuellen Oligonucleotide, so zeigen die Hexameren mit den palindromischen (Adenin-Guanin)-Sequenzen $ddGlc(A_2-G_2-A_2)$ und $ddGlc(G_2-A_2-G_2)$ das gegenteilige Verhalten. Dies belegen die in Fig. 18 zusammengefassten experimentellen Beobachtungen. Insbesondere weist das gel-elektrophoretische Experiment nach, dass sich die beiden Selbstpaarungskomplexe der individuellen Oligonucleotide im (1:1)-Gemisch nicht in einen Mischpaarungskomplex umwandeln.

Für die Interpretation der in den Fig. 15–18 behandelten Befunde hat man davon auszugehen, dass man vorab nicht weiss, ob erstens eine heteropurinische Paarung Adenin-Guanin gegenüber den homopurinischen Paarungen Adenin-Adenin und Guanin-Guanin bevorzugt ist, ob zweitens auch hier der antiparallele Paarungsmodus dem parallelen Modus überlegen ist und ob drittens gegebenenfalls gar das eine für das erste und das andere für das zweite (und umgekehrt) zutrifft. Von der begründeten Voraussetzung²⁵⁾ ausgehend, dass es sich bei diesen in beiden Versuchsreihen beobachte-

²⁵⁾ Es ist dies eine Extrapolation der experimentell begründeten Auffassung, wonach es sich in den (Purin-Purin)-Selbstpaarungs-Komplexen $ddGlc(A_6)$ sowie $ddGlc((A-G)_3)$ (vgl. Kap. 2.7 und 3.2) um Duplexe handelt. Für den Mischpaarungs-Komplex $ddGlc(A_3-G_3)/ddGlc(G_3-A_3)$ wurde explizite ausgeschlossen, dass es sich um einen Komplex mit ungerader Paarungs-Stöchiometrie (z. B. einen Triplex) handeln könnte (vgl. Fig. 15).

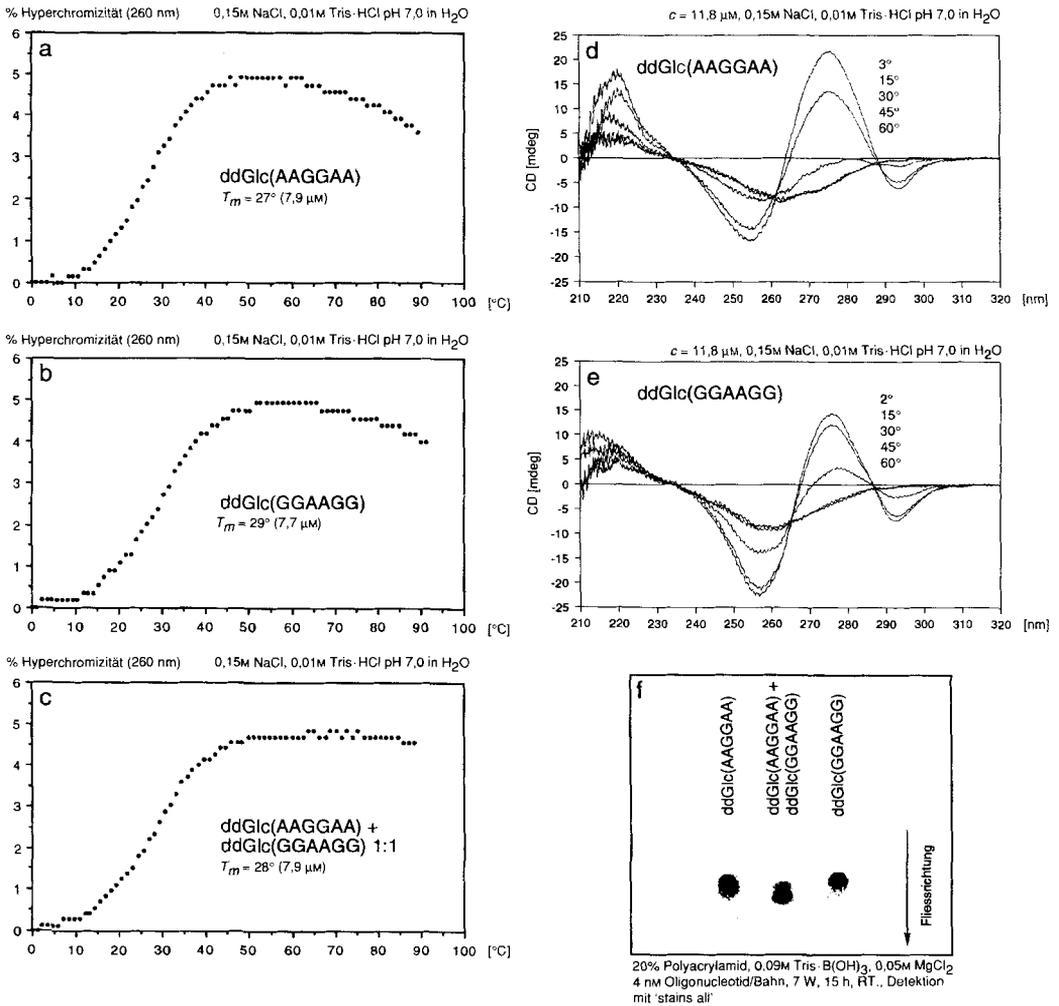


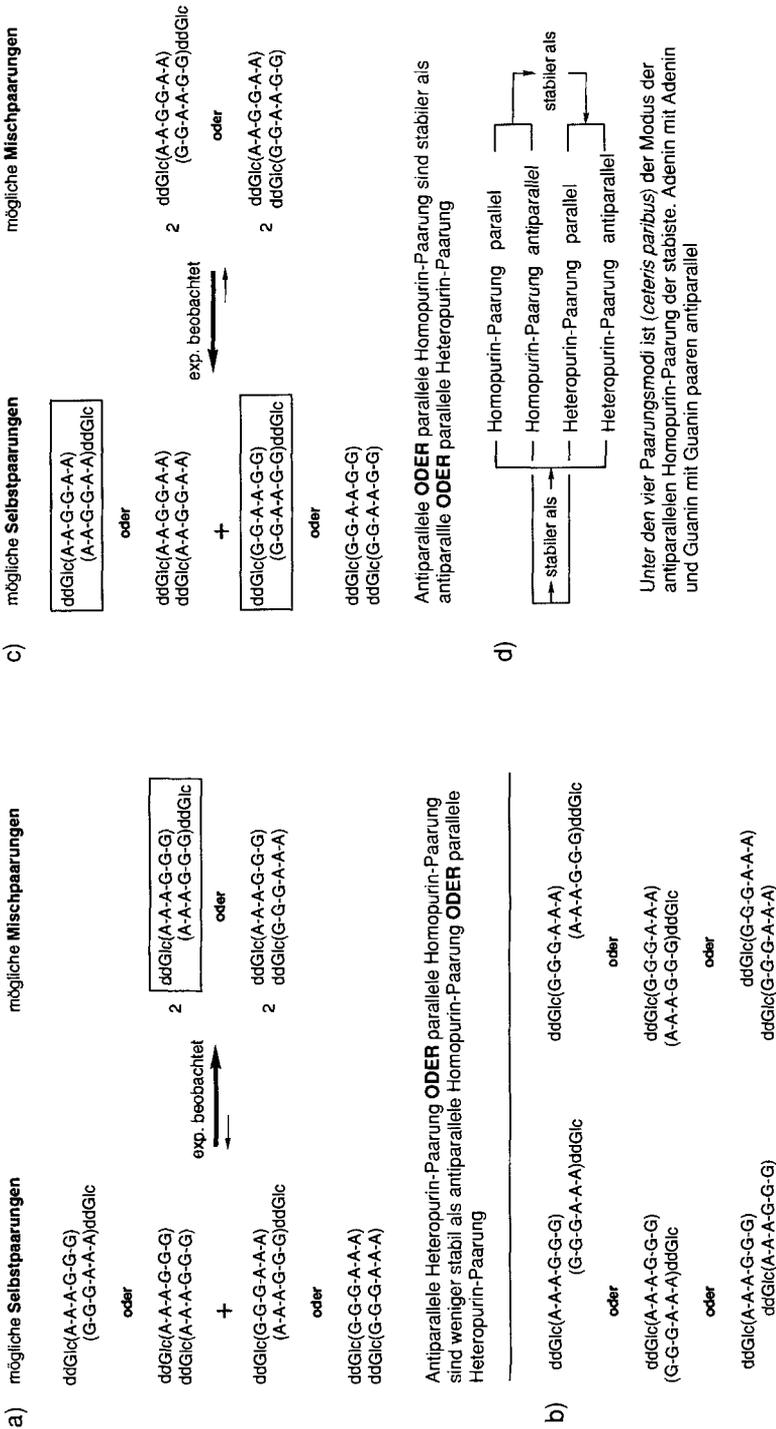
Fig. 18. Selbstpaarung der palindromischen Oligonucleotide $ddGlc(A_2-G_2-A_2)$ und $ddGlc(G_2-A_2-G_2)$ *)

*) UV-Hyperchromicity curves and gel-electrophoretic behavior under non-denaturing conditions, of the palindromic oligomers $ddGlc(A-A-G-G-A-A)$ and $ddGlc(G-G-A-A-G-G)$ indicate that the self-pairing complexes of both oligomers ($T_m = 27^\circ$ and 29° , respectively) do not disproportionate to a more stable complex on 1:1 mixing, in sharp contrast to the oligomers of Fig. 15–17. The self-pairing of the palindromic sequences is reflected in CD spectra (Fig. 18d, e) which are characteristic for homo-DNA purine-purine pairing (see Fig. 1d and 10e). The observations summarized in Fig. 15–18 point to a spatial compatibility of adenine-adenine with guanine-guanine pairing in homo-DNA complexes.

ten Selbst- und Mischpaarungskomplexen durchwegs um Duplexe handelt, zeichnet Schema 4 den Weg der Argumentation nach, welche zur Schlussfolgerung der antiparallelen homopurinischen Paarung führt.

Unabhängig davon, welcher der in Schema 4a links aufgeführten, grundsätzlich möglichen Paarungstypen für die Selbstpaarungskomplexe der Oligonucleotide $ddGlc(A_3-G_3)$

Schema 4. Herleitung der Strang-Orientierung für (A/A)- und (G/G)-gepaarte ddGlc-Duplexe*



*) In ddGlc complexes containing adenine and guanine, is the binding based on homopurine pairing or on heteropurine pairing, and does the pairing prefer antiparallel or parallel strand orientation? The *Scheme* summarizes the logic used to answer these questions, based on the postulate that only duplexes are being dealt with throughout (*c.f.* discussion for *Table 1*). Part *a* of the *Scheme* concludes, from experimental observation, that antiparallel heteropurine pairing *or* parallel homopurine pairing are less stable than antiparallel homopurine pairing *or* parallel heteropurine pairing. (The argument would not change, if the constitution of the self-paired complexes would correspond to one shown in part *b*.) Part *c*, on the other hand, concludes from experiment that antiparallel *or* parallel homopurine pairing are more stable than antiparallel *or* parallel heteropurine pairing. Superposition of the two conclusions (part *d*) leads to the final conclusion (*that, among the four pairing modes, the one of antiparallel homopurine pairing is (ceteris paribus) the favored mode.*

und ddGlc(G₃-A₃) tatsächlich zutrifft (Analoges gilt für ddGlc(A₄-G₄) und ddGlc(G₄-A₄)), ist aus der in dieser Reihe beobachteten Tatsache der bevorzugten Bildung eines Mischpaarungskomplexes (Duplexes) zu schliessen, dass antiparallele Heteropurin-Paarungen *oder* parallele Homopurin-Paarungen weniger stabil sind als antiparallele Homopurin-Paarungen *oder* parallele Heteropurin-Paarungen. Diese Folgerung gilt rigoros auch dann, wenn die Selbstpaarungskomplexe der Komponenten nicht als sechsfach gepaarte, sondern nur als dreifach gepaarte Duplexe mit verschobenem Paarungsrahmen (*Schema 4b*) vorliegen. In diesem Fall müsste der Mischpaarungskomplex ohnehin stabiler sein, da dieser den jeweils gleichen Paarungsmodus sechsfach statt dreifach anbietet; er wäre damit jedenfalls auch stabiler als die in *Schema 4a* aufgeführten Selbstpaarungskomplexe. In der Reihe der palindromischen Hexameren ddGlc(A₂-G₂-A₂) und ddGlc(G₂-A₂-G₂) verhalten sich die individuellen Stränge als selbstkomplementär und bilden Selbstpaarungskomplexe (Duplexe), die als solche stabiler sind als beide in Frage kommenden Mischpaarungskomplexe (*Schema 4c*). Dies muss heissen, dass antiparallele *oder* parallele Homopurin-Paarungen stabiler sind als antiparallele *oder* parallele Heteropurin-Paarungen. Die Kombination der beiden Folgerungen aus den beiden Versuchsreihen führt zur Schlussfolgerung, dass unter den vier Paarungsmodi homopurinisch-parallel, homopurinisch-antiparallel, heteropurinisch-parallel und heteropurinisch-antiparallel der Modus der antiparallelen Homopurin-Paarung (*ceteris paribus*) der stabilste ist. Die (A/A)- und (G/G)-Paarungen der Homo-DNS-Reihe verlangen demnach antiparallele Strang-Orientierung.

Schema 5. Weitere Beispiele von (A/A)- und (G/G)-gepaarten ddGlc-Duplexen*)

	<i>T_m</i>	
ddGlc(A-A- G-A-G -G G- G-A-G -A-A)ddGlc	< 15°	(7.0 μM)
ddGlc(G-G- A-G-A -A) (A- A-G-A -G-G)ddGlc	< 10°	(7.9 μM)

1:1 ddGlc(A-A-G-A-G-G) (A-A-G-A-G-G)ddGlc	22°	(7.5 μM) Mischpaarungs-Komplex

ddGlc(A- G-A-G-A-G) (G-A-G-A-G -A)ddGlc	35°	(14.6 μM)
ddGlc(A-A-G-A-A -G) (G- A-A-G-A-A)ddGlc	34°	(14.8 μM)
ddGlc(A- A-G-A-G-A) (A-G-A-G-A -A)ddGlc	31°	(13.2 μM)

*) Further adenine- and guanine-containing ddGlc oligomers which have been shown by UV-hyperchromicity measurements to pair with themselves (see *T_m* values) and (in the case of the first two sequences) to form a mixed 1:1 complex which is more stable than the self-pairing complexes of the partner strands. All complexation can be interpreted consistently as based on *quasi*-isomorphic adenine-adenine and guanine-guanine pairs with antiparallel strand orientation and (with the exception of the mixed complex) frame-shifts to maximize the number of purine-purine pairs. The mutual pairing behavior of the oligomers ddGlc(A-A-G-A-G-G) and ddGlc(G-G-A-G-A-A) as well as of ddGlc(A₃-G₃) and ddGlc(G₃-A₃) excludes the possibility that adenine-guanine pairing is being dealt with (*cf.* [6]).

In *Schema 5* sind weitere (Adenin-Guanin)-Sequenzen aufgeführt, welche wir im Zuge der Untersuchungen über die Homopurin-Paarung in der Homo-DNS-Reihe hergestellt haben²⁶). Alle diese Sequenzen bilden gemäss ihrer UV-spektroskopisch bestimmten Schmelz-Kurven Selbstpaarungskomplexe, die beiden erstaufgeführten Sequenzen zudem einen (höher schmelzenden) Mischpaarungskomplex²⁷). Die Komplexe sind hier als antiparallel-gepaarte Duplexe mit maximaler Zahl von Homopurin-Paarungen formuliert, was bei sämtlichen Selbstpaarungs-Komplexen eine gegenseitige Verschiebung des Sequenzrahmens erfordert. Die Basensequenz ddGlc((A-G)₃) mit regelmässig alternierenden (Adenin-Guanin)-Basen bildet einen Duplex, den wir ¹H- und ³¹P-NMR-spektroskopisch näher charakterisiert haben (*Kap. 3.2.3*); *Fig. 19* zeigt seine UV- und CD-spektroskopischen Kenndaten im Vergleich mit den entsprechenden Daten des Hexamers d((A-G)₃) der natürlichen Reihe.

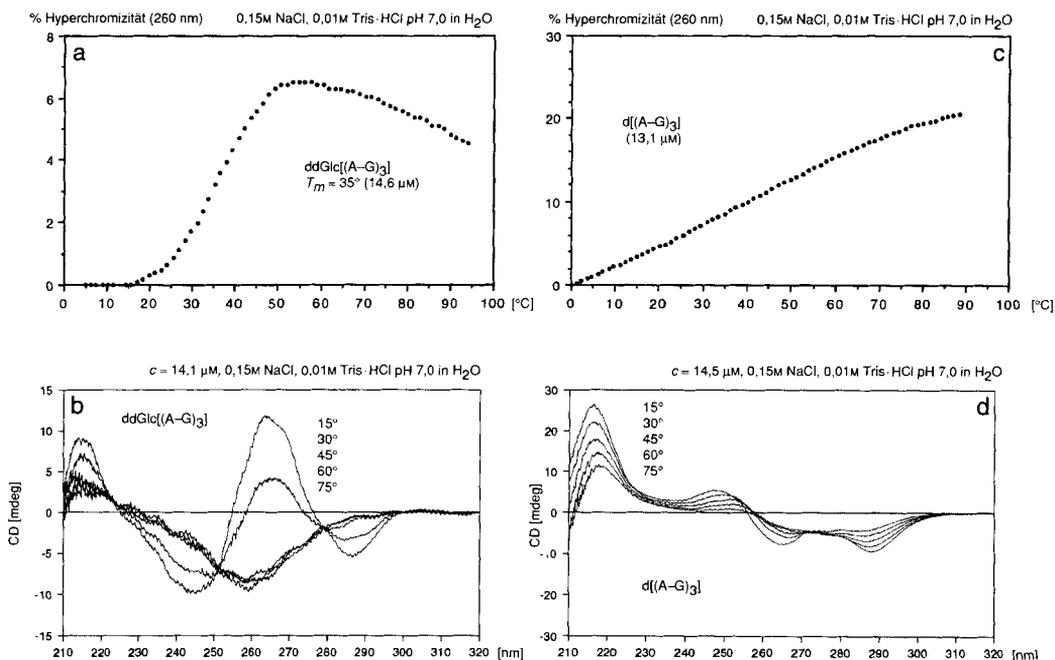


Fig. 19. Vergleich von ddGlc((A-G)₃) mit d((A-G)₃)*)

*) The self-pairing of ddGlc((A-G)₃) compared with the behavior under similar conditions of the corresponding hexamer d((A-G)₃) in the natural series.

²⁶) Über die Herstellung und (orientierende) Charakterisierung von (vermutlichen) Hairpin-Oligonucleotiden des Typs ddGlc(A₅)-d(T₄)-ddGlc(A₅), deren Eigenschaften mit dem Postulat der Antiparallelität der (Adenin-Adenin)-Paarung übereinstimmen, vgl. [5].

²⁷) Die (1:1)-Stöchiometrie der Mischpaarung von ddGlc(A-A-G-A-G-G) und ddGlc(G-G-A-G-A-A) wurde UV-spektroskopisch (260 nm, 20°, Σc = 8 · 10⁻⁶ M) und die Bildung eines Mischpaarungskomplexes durch Gel-Elektrophorese (analog wie in *Fig. 17*) nachgewiesen (vgl. [6], S. 49).

Zur Frage nach den Eigenschaften einer bislang hypothetisch verbliebenen, antiparallel-heteropurinischen (Adenin-Guanin)-Paarung in Homo-DNS-Oligonucleotiden zeigen insbesondere die Erfahrungen mit den Sequenzen ddGlc(A-A-A-G-G-G) und ddGlc(G-G-G-A-A-A) (*Schema 4a*) sowie ddGlc(A-A-G-A-G-G) und ddGlc(G-G-A-G-A-A) (*Schema 5*), dass eine solche Paarung – wenn sie überhaupt eine Rolle spielt – im Vergleich zu den homopurinischen Paarungen schwächer zu sein hat.

2.7. (Purin-Pyrimidin)-gepaarte Duplexe der Homo-DNS-Reihe sind thermodynamisch stabiler als entsprechende Duplexe der DNS-Reihe; die Gründe hierfür sind nicht enthalpischer, sondern ausschliesslich entropischer Natur. Wie bereits im *Kap. 2.2* am Beispiel von (Adenin-Thymin)-gepaarten Komplexen illustriert und erörtert, weisen Oligonucleotid-Paarungskomplexe der Homo-DNS-Reihe durchwegs höher liegende Schmelz-Temperaturen auf als entsprechende Duplexe der DNS-Reihe. Ebenso wie für ausschliesslich (Adenin-Thymin)-gepaarte Komplexe trifft dies – wenn auch weniger ausgeprägt – für solche mit (Guanin-Cytosin)-Paarung zu; Duplexe mit Paarungen beiderlei Typs verhalten sich analog. In dem Sinne, dass für exklusiv durch (Purin-Purin)-Paarungen zusammengehaltene Duplexe keine direkten Vergleichskomplexe in der DNS-Reihe existieren, gilt die Aussage von der höheren Stabilität der Homo-DNS-Duplexe auch für diese letztgenannten Paarungstypen. Durch Ermittlung der thermodynamischen Daten aus der Konzentrationsabhängigkeit der Duplex-Entpaarungstemperaturen nach der von *Breslauer* [11] beschriebenen und begründeten Art des Vorgehens (vgl. *Exper. Teil*) haben wir den Stabilitätsvergleich quantifiziert; *Tab. 1* gibt den Überblick über die erhaltenen Daten. Dadurch, dass wir diese Methode der Bestimmung von ΔH -, ΔS - und ΔG -Werten der Paarungsprozesse anwenden, unterstellen wir zum einen eine derart weitgehende Kooperativität der Entpaarungs(Schmelz)vorgänge, dass das der Theorie der Bestimmungsmethode zugrunde liegende ‘Zwei-Zustände-Modell’ [11] zur erlaubten Approximation wird, und zum andern unterstellen wir die Richtigkeit des Postulats, dass die Stöchiometrie der Paarungsprozesse in allen untersuchten Fällen jene einer Duplexierung ist. Die erste der Annahmen dürfte bei (kurzen) Oligonucleotiden der Homo-DNS-Reihe ebenso – wenn nicht gar eher – zu Recht bestehen als in der DNS-Reihe, denn generell tendieren Homo-DNS-Schmelzkurven eine eher ausgeprägt sigmaoide Form aufzuweisen als entsprechende Schmelzkurven der DNS-Reihe; dementsprechend zeigen die der Ermittlung der ($\Delta H/\Delta S$)-Werte dienenden $1/T_m$ vs. ($\ln c$)-Relationen (vgl. *Fig. 1c, 7c* und *f, 10c, 12c, 20c* sowie *Exper. Teil*) generell befriedigende Linearität innerhalb des für die Wert-Ermittlung benützten Konzentrationsbereichs. Das Postulat der Duplex-Struktur der untersuchten Homo-DNS-Paarungskomplexe stützt sich auf die generell einstufige Form der Schmelz-Kurven im zugänglichen Temperatur-Messbereich unter den gewählten Mess-Bedingungen, auf den entsprechenden Verlauf der temperaturabhängigen CD-Spektren, in ausgewählten Fällen mit nicht-selbstkomplementären Basensequenzen auf UV-spektroskopische Ermittlung der Paarungsstöchiometrie (vgl. *Fig. 4d, 11b, 15c*), auf das relativ zu authentischen Duplexen beobachtete gel-elektrophoretische Laufverhalten (vgl. *Fig. 6, 11, 14b, 17, 18f, 21, 22*) sowie schliesslich in vier Fällen auf die Interpretation von $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Daten (vgl. *Kap. 3.2.3* und insbesondere die NMR-Strukturanalyse für ddGlc(A₃-T₃) im Teil IV dieser Reihe [12]). Im übrigen weisen die auf der Basis des Duplex-Postulats ermittelten thermodynamischen Daten unter sich und in Relation zur Substrat-Konstitution eine dergestalt durchgehende Kohärenz der Zahlenwerte auf, dass diese an sich eine gewichtige Stütze des Postulats

Tab. 1. Thermodynamische Daten von ddGlc-Duplexen im Vergleich zu d-Duplexen³⁰⁾*

Nr.	<i>(Purin-Pyrimidin)</i> -Paarungen	T_m [°C]	ΔH [kcal/mol]	$T \cdot \Delta S$ (25°) [kcal/mol]	ΔG (25°) [kcal/mol]	Hyperchromizität in ca. % (Detektionswellenlänge)
1	ddGlc(A-T-A-T-A-T-A-T-A-T-A-T-T) (T-A-T-A-T-A-T-A-T-A-T-A)ddGlc selbstkomplementär	59 (9,3 μM)	-60,2	-47,1	-13,1	25 (260 nm)
	d(A-T-A-T-A-T-A-T-A-T-A-T-T) (T-A-T-A-T-A-T-A-T-A-T-A)d	24 (8,9 μM)	-65,2	-59,7	-5,5	35 (260 nm)
2	ddGlc(A-U-A-U-A-U-A-U-A-U-A-U) (U-A-U-A-U-A-U-A-U-A-U-A)ddGlc selbstkomplementär	43 (7,2 μM)	-51,2	-41,1	-10,1	20 (260 nm)
	d(A-U-A-U-A-U-A-U-A-U-A-U) (U-A-U-A-U-A-U-A-U-A-U-A)d	19 (10,5 μM)	-52,5	-46,9	-5,6	30 (260 nm)
3	ddGlc(A-A-A-A-T-T-T-T) (T-T-T-T-A-A-A-A)ddGlc selbstkomplementär	59 (48 μM)	-44,0	-33,5	-10,5	22 (260 nm)
	d(A-A-A-A-T-T-T-T) (T-T-T-T-A-A-A-A)d	33 (50 μM)	-61,3	-54,2	-7,1	35 (260 nm)
4	ddGlc(G-G-G-G-G-G) (C-C-C-C-C-C)ddGlc selbstkomplementär	61 (50 μM)	-39,5	-28,6	-10,9	22 (280 nm)
	d(G-G-G-G-G-G) (C-C-C-C-C-C)d	33 (50 μM)	-61,3	-54,2	-7,1	35 (280 nm)
5	ddGlc(G-C-G-C-G-C) (C-G-C-G-C-G)ddGlc selbstkomplementär	64 (50 μM)	-39,7	-29,4	-10,3	30 (280 nm)
	d(G-C-G-C-G-C) (C-G-C-G-C-G)d	52 (50 μM)	-61,5	-50,7	-10,8	50 (280 nm)
6	ddGlc(C-G-C-G-C-G) (G-C-G-C-G-C)ddGlc selbstkomplementär	49 (29 μM) [11c]	-58,1 [11c] [24]	-47,8 [11c] [24]	-10,3 ^{B)}	23 (280 nm)
	d(C-G-C-G-C-G) (G-C-G-C-G-C)d	62 (35 μM)	-41,4	-30,8	-10,6	23 (280 nm)
7	ddGlc(A-A-C-A-T-A-C-T) (T-T-G-T-A-T-G-A)ddGlc selbstkomplementär	53 (39 μM)	-53,7	-43,5	-10,2	55 (280 nm)
	d(A-A-C-A-T-A-C-T) (T-T-G-T-A-T-G-A)d	45 (10 μM) [24]	-46,4 [24]	-36,6 [24]	-9,8 ^{B)}	18 (260 nm)
		48 (10 μM)	-42,4	-32,1	-10,3	18 (260 nm)
		22 (10 μM)	-51,3	-44,3	-7,0	25 (260 nm)

Tab. 1 (Forts.)

Nr.		T_m [°C]	ΔH [kcal/mol]	$T \cdot \Delta S$ (25°) [kcal/mol]	ΔG (25°) [kcal/mol]	Hyperchromizität in ca. % (Detektionswellenlänge)
8	ddGlc(C-G-A-A-T-T-C-G) (G-C-T-T-A-A-G-C)ddGlc selbstkomplementär	51 (10 μM)	-55,3	-44,7	-10,6	12 (260 nm)
8a	ddGlc(C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G) (G-C-G-C-T-T-A-A-G-C-G-C)ddGlc selbstkomplementär	86 (10 μM)	-49,4	-34,6	-14,8	12 (260 nm)
9	ddGlc(A-C-A-C-A-C-A-C-A-C) (C-A-C-A-C-A-C-A-C-A)ddGlc selbstkomplementär	58 (10 μM) 30 (11,5 μM)	-65,2 [11b] -61,6	-50,7 [11b] -53,8	-14,5 [11c] -7,8	17 (260 nm) 12 (260 nm)
10	ddGlc(C-A-C-A-C-A-C-A-C-A) (A-C-A-C-A-C-A-C-A-C)ddGlc selbstkomplementär	29 (8,3 μM)	-53,0	-45,1	-7,9	12 (260 nm)
<i>(Purin-Purin)-Paarungen</i>						
11	ddGlc(A-A-A-A-A) (A-A-A-A-A)ddGlc selbstkomplementär	47 (15 μM)	-39,4	-30,2	-9,2	7 (260 nm)
12	aus kalorimetrischer Messung ²⁹) [30] [31]: ddGlc(G-G-G-G-G) (G-G-G-G-G)ddGlc selbstkomplementär	67 (454 μM) 38 (20 μM) ^b	-40,1 -45,2	-35,5 -36,8	-4,6 -8,4	13 (250 nm)
13	ddGlc(A-A-A-A-G-G-G-G) (G-G-G-G-A-A-A-A)ddGlc selbstkomplementär	33 (20 μM) ^b	-39,3	-31,9	-7,4	12 (260 nm)
14	ddGlc(G-G-G-G-A-A-A-A) (A-A-A-A-G-G-G-G)ddGlc selbstkomplementär	33 (20 μM) ^b	-41,5	-34,1	-7,4	16 (260 nm)
15	ddGlc(A-A-A-A-G-G-G-G) (A-A-A-A-G-G-G-G)ddGlc selbstkomplementär	51 (12 μM)	-55,6	-43,6	-12,0	6 (260 nm)
16	ddGlc(A-A-A-A-G-G-G) (A-A-A-A-G-G-G)ddGlc selbstkomplementär	29 (15 μM)	-40,4	-32,5	-7,9	6 (260 nm)
17	ddGlc(A-A-G-G-A-A) (A-A-G-G-A-A)ddGlc selbstkomplementär	29 (20 μM) ^b	-54,3	-47,1	-7,2	5 (260 nm)

Tab. 1 (Forts.)

Nr.		T_m [°C]	ΔH [kcal/mol]	$T \cdot \Delta S$ (25°) [kcal/mol]	ΔG (25°) [kcal/mol]	Hyperchromizität in ca. % (Detektionswellenlänge)
18	ddGlc(G-G-A-A-G-G) (G-G-A-A-G-G)ddGlc selbstkomplementär	32 (20 μM) ^b	-45,3	-37,7	-7,6	5 (260 nm)
19	ddGlc(A-G-A-G-A-G) (G-A-G-A-G-A)ddGlc selbstkomplementär	37 (20 μM) ^b	-37,5	-29,5	-8,0	7 (260 nm)
20	ddGlc(A-A-G-A-A-G) (G-A-A-G-A-A)ddGlc selbstkomplementär	36 (20 μM) ^b	-47,3	-39,3	-8,0	5 (260 nm)
21	ddGlc(A-A-G-A-G-A) (A-G-A-G-A-A)ddGlc selbstkomplementär	33 (20 μM) ^b	-43,9	-36,3	-7,6	10 (260 nm)
22	ddGlc(G-G-G-G-G-T-T) (T-T-G-G-G-G-G)ddGlc selbstkomplementär	39 (20 μM) ^b	-49,9	-41,3	-8,6	9 (260 nm)
23	ddGlc(T-T-G-G-G-G-G) (G-G-G-G-G-T-T)ddGlc selbstkomplementär	48 (20 μM) ^b	-50,5	-40,9	-9,6	10 (260 nm)

^a) Spezielle Bedingungen in [1] c) [24]: 1,0M NaCl, 0,045M Natrium-cacodylat pH 7,0.

^b) T_m berechnet aus $(1/T_m)$ vs. $\ln(c)$ -Geraden für $c = 20 \mu\text{M}$.

^{*}) The *Table* lists the melting temperatures T_m , the maximal UV hyperchromicities H [%], and the thermodynamic data for homo-DNA oligonucleotides and, whenever possible, compares these data with those for isosequential DNA oligonucleotides. T_m Values are found to be uniformly higher, and hyperchromicities lower, in the homo-DNA than in the DNA series. Thermodynamic data were deduced from the dependence of T_m values on oligonucleotide concentration, according to Breslauer [11], and presupposing that the stoichiometry of the observed pairing complexes is that of duplexes. This postulate is compatible with all observations made on the properties of homo-DNA oligonucleotides under the conditions used: the monotonous structure of UV-hyperchromicity curves and of the ensemble of temperature-dependent CD curves, the stoichiometric ratio determined by UV spectroscopy for non-self-complementary oligonucleotides, gel-electrophoretic behavior, the numerical coherence of thermodynamic data among the various oligonucleotides, when calculated on the basis of duplex stoichiometry, and – in the case of ddGlc(A₆) – agreement of ΔH and ΔS values when determined from T_m values as well as from microcalorimetry. Duplexation ΔH values of homo-DNA oligonucleotides are found to be lower and (negative) ΔS values overcompensatingly lower throughout, when compared to those of corresponding DNA oligonucleotides. UV Melting curves of homo-DNA oligonucleotide duplexes are found to be essentially identical with the corresponding pairing ('cooling') curves; from their sigmoidal form, it can be assumed that cooperativity in melting is at least (if not more) pronounced in the homo-DNA than in the DNA series.

darstellt²⁸). Eine unabhängige mikrokalorimetrische Bestimmung der ΔH - und ΔS -Werte, welcher bei Übereinstimmung in ihrer Grössenordnung mit den aus der Konzentrationsabhängigkeit der Schmelz-Temperaturen ermittelten ΔH - und ΔS -Werte den Rang einer unabhängigen und spezifischen Bestätigung der Duplex-Natur zukommt [29], ist bislang einzig für den besonders wichtigen Fall der Selbstpaarung von ddGlc(A₆) vorgenommen worden; das Ergebnis (vgl. Tab. I, Nr. 11) weist nach, dass der beobachtete Paarungskomplex von ddGlc(A₆) in der Tat ein Duplex ist²⁹).

Die in der Tab. I³⁰) aufgeführten Homo-DNS-Oligonucleotide sind in die zwei Gruppen (Purin-Pyrimidin)- und (Purin-Purin)-Paarungskomplexe aufgeteilt. Ein Vergleich der thermodynamischen Daten mit entsprechenden Daten der natürlichen Reihe ist dabei nur innerhalb der ersten Gruppe möglich, da sich in der DNS-Reihe unter den in Frage stehenden Bedingungen mit kurzen, exklusiv aus Adenin oder Guanin bestehenden Basensequenzen keine kooperativ und reversibel schmelzenden Oligonucleotid-Duplexe beobachten lassen (vgl. Fig. 1f, 2, 10d, 19c und 19d). Die Vergleichsmöglichkeit fehlt auch für die Duplexe mit alternierenden (Adenin-Cytosin)-Sequenzen ddGlc((A-C)_n) und ddGlc((C-A)_n)³¹), denn in der DNS-Reihe bilden sich keine solchen Duplexe (vgl. Fig. 12d). In der Gruppe der auf (Purin-Pyrimidin)-Paarung beruhenden Homo-DNS-Duplexe haben wir (bislang) bei acht Beispielen den Vergleich der thermodynamischen Daten der Duplexierung mit den entsprechenden Daten der entsprechenden, meist eigens zu diesem Zwecke hergestellten und unter identischen Bedingungen gemessenen Oligonucleotid-Duplexe der DNS-Reihe herbeigeführt. Die in den Schmelz-Temperaturen zum Ausdruck kommende, höhere thermodynamische Stabilität der Oligonucleotid-Duplexe des Homo-DNS-Typs gegenüber jenen des DNS-Typs reflektiert sich im wesentlichen durchgehend in entsprechend deutlich negativeren ΔG -Werten; einzig bei den Hexameren mit alternierenden (G-C)-Basenpaaren (Nr. 5, 6 und 8a) liegen die Vergleichswerte wohl innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmungsmethode. Ausnahmslos präsentieren sich die ΔG -Unterschiede zwischen Homo-DNS- und DNS-Reihe als das Ergebnis von geringer-negativen ΔH -Werten und überkompensierend geringer-negativen $T\Delta S$ -Werten der Homo-DNS-Duplexierung. Dabei variieren die ($\Delta H/\Delta S$)-Relativgewichte ziem-

²⁸) In der für die Ermittlung der ($\Delta H/\Delta S$)-Werte von Paarungsprozessen selbstkomplementärer Stränge benutzten Beziehung $1/T_m = a \ln c + b$ [7] (vgl. *Exper. Teil* und [11]) bedeuten c = Oligonucleotid-Konzentration, $a = R(n-1)/\Delta H$ und $b = \Delta S(n-1)R \ln 2 + R \ln(n)/\Delta H$, n = Molekularität des Paarungsprozesses. Würde man bei der Ermittlung der thermodynamischen Daten z. B. für die Selbstpaarung von ddGlc(A₆) nach dieser Beziehung für n den Wert 3 (Bildung eines Triplexes) einsetzen, so ergäbe dies die Werte $\Delta H = -78,9$ kcal/mol und $T\Delta S = -60,4$ kcal/mol anstelle der mit $n = 2$ (Bildung eines Duplexes) sich errechnenden Werte $\Delta H = -39,4$ kcal/mol und $T\Delta S = -30,2$ kcal/mol.

²⁹) Die erst kürzlich durchgeführte, kalorimetrische Bestimmung der Paarungsenthalpie und -entropie von ddGlc(A₆) erfolgte auf einem *Microcal MC-2* Differenzmikrokalorimeter nach literaturbekannten und an DNS-Oligonucleotiden erprobten Verfahren [30][11b] ($c = 0,908$ mM ddGlc(A₆) in 10 mM Na-Phosphat-Puffer, 0,15M NaCl in H₂O, pH 7; ΔH - und ΔS -Werte durch Flächenintegration ermittelt). Die experimentellen Details zu diesen Messungen werden in einer späteren Publikation von einem von uns (C. L.) enthalten sein [31].

³⁰) Sämtliche Bestimmungen der thermodynamischen Daten wurden nach [11] unter folgenden Bedingungen (falls nicht anders angegeben) durchgeführt: 0,15M NaCl, 0,01M Tris-HCl-Puffer, pH 7,0. Über Einzelheiten der hier aufgeführten Daten vgl. [6] für Nr. 4-6, 12-23, [5] für Nr. 11, [4] für Nr. 3 sowie [7] für Nr. 1, 2, 7, 9, 10.

³¹) Die UV-spektroskopische Überprüfung der d((C-A)_n)-Reihe ($n = 3-6$) ergab ein völlig analoges Bild wie bei der d((A-C)_n)-Reihe in Fig. 12, vgl. [7].

lich stark mit der Basensequenz; bei den Duplexen Nr. 3, 4 und 5 liegt der ΔH -Wert der Homo-DNS-Duplexierung um rund $\frac{2}{3}$ des ΔH -Werts der entsprechenden DNS-Duplexierung. Die Frage nach der Interpretation der Unterschiede in den thermodynamischen Daten der Duplex-Bildung in der Homo-DNS- und DNS-Reihe wird in *Kap. 5* erörtert.

Tab. 1 enthält eine zusätzliche Rubrik, in welcher die bei der UV-spektroskopischen Bestimmung der Schmelz-Kurven beobachteten Hyperchromizitäts-Bereiche (mit Detektionswellenlänge) aufgeführt sind. Diese sind in der Homo-DNS-Reihe generell geringer als jene entsprechender Duplexe der DNS-Reihe; dieses Phänomen ist im Zusammenhang mit der die Basenstapelung und damit die Rückgrat-Konformation miteinzubeziehenden Erörterung der Paarungsenthalpien von Belang.

2.8. (Purin-Pyrimidin)-Basensequenzen mit Homo-DNS-Rückgrat paaren nicht mit Basensequenzen, die zwar komplementär sind, aber ein DNS-Rückgrat aufweisen. Im einführenden Teil [1] zu dieser Abhandlungsreihe ist dargelegt worden, dass die zum Ensemble der geringst gespannten Konformationen zugehörige und zugleich paarungsfähige (idealisierte) Konformation eines Homo-DNS-Einzelstrangs linear sein würde, die entsprechend (idealisierte) Konformation eines DNS-Einzelstrangs jedoch aus dem Grunde der Fünfgliedrigkeit des Furanose-Rings (rechtsgängig) helikal ist. Diese Voraussage führt unmittelbar zur Frage: Sind Oligonucleotid-Einzelstränge paarungsfähig, wenn ihre Basensequenzen zwar komplementär sind, jedoch das Rückgrat des einen Strangs dem Homo-DNS- und dasjenige des andern dem DNS-Typ angehört? Ob die beiden unterschiedlichen Rückgrat-Strukturtypen in Richtung auf einen die Hybrid-Paarung erlaubenden Struktur-Typ konformationell genügend deformierbar sein werden, d. h. ob der enthalpische Ansporn von Basenpaarung und Basenstapelung zu einer solchen konformationellen Anpassung genügen würde, war schwierig vorauszusagen. Die Frage ist jedoch experimentell leicht beantwortbar. *Fig. 20* und *21* zeigen Experimente, die wir zu ihrer Abklärung angestellt haben.

Die beiden sigmaoiden Schmelz-Kurven in *Fig. 20* illustrieren normales Paarungsverhalten der zueinander (antiparallel) komplementären (aber nicht-selbstkomplementären³²⁾) Basensequenzen d (bzw. ddGlc) (A-A-C-A-T-A-C-T) und d (bzw. ddGlc) (A-G-T-A-T-G-T-T) innerhalb der DNS-, wie auch der Homo-DNS-Reihe; charakteristisch sind wiederum die höhere Schmelz-Temperatur, die geringere (negative Paarungsenthalpie, die überkompensierend geringere (negative) Paarungsentropie sowie die geringere Hyperchromizität des Duplexes in der Homo-DNS-Reihe (Nr. 7 in *Tab. 1*). Der Kern des Experiments besteht in der Beobachtung des Paarungsverhaltens bei Zugabe von 1 equiv. des DNS-Einzelstrangs d(A-A-C-A-T-A-C-T) zu 1 equiv. des Homo-DNS-Oligonucleotids ddGlc(A-G-T-A-T-G-T-T)³²⁾ (antiparallel komplementäre Basensequenz): die resultierende Hyperchromizitätskurve zeigt überzeugend Nicht-Paarung im gesamten Messbereich. Das der Vollständigkeit halber ebenfalls in der Versuchsreihe aufgenommene Homo-DNS-Octamer ddGlc(T-T-C-T-A-T-C-A) mit *parallel*-komplementärer Basensequenz zeigt ebenfalls keine Anzeichen einer Hybrid-Paarung.

³²⁾ Die ausgewählten Basensequenzen sind nicht-selbstkomplementär bezüglich normaler *Watson-Crick*-Paarung. Im temperatur-abhängigen UV-Spektrum zeigen die beiden d-Sequenzen für sich bei Temperatur-Anstieg von 0→80° nur einen linearen Anstieg der Hyperchromizität auf ca. 8%. Die Hyperchromizitätskurve von ddGlc(A-G-T-A-T-G-T-T) präsentiert sich hingegen als Plateau (Hyperchromizität ca. 5%), das ab ca. 20° gegen 0° abfällt; demgegenüber bildet die Sequenz ddGlc(A-A-C-A-T-A-C-T) einen bei 20° ($c = 8,5 \mu\text{M}$) schmelzenden Selbstpaarungskomplex. Zur Konstitutionsfrage vgl. *Kap. 3*.

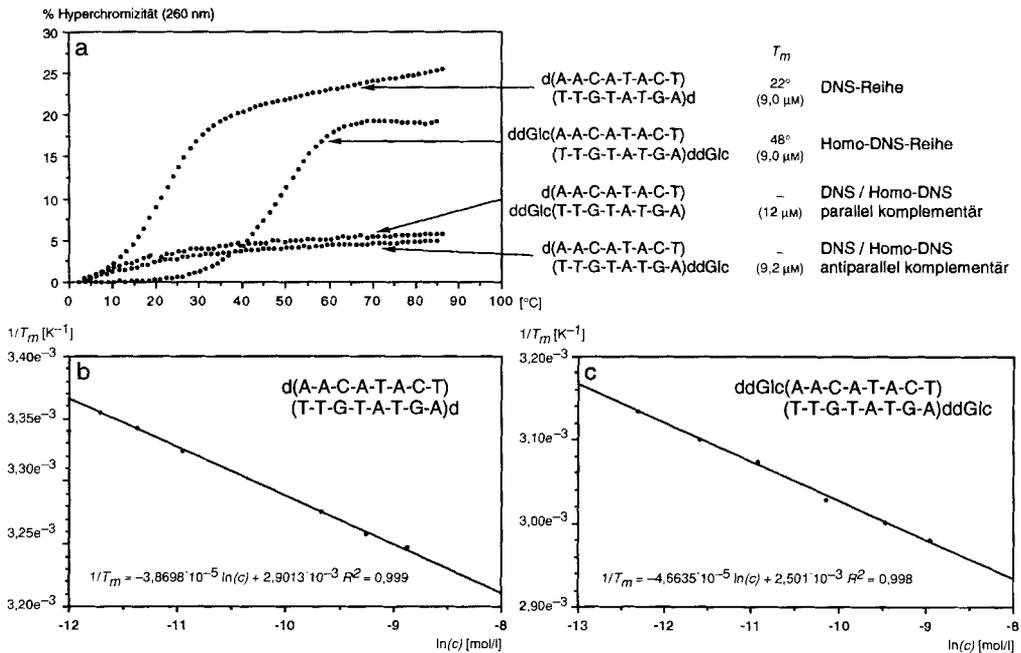


Fig. 20. Experiment zur Frage nach der Kreuzpaarung zwischen ddGlc- und d-Oligonucleotiden*)

*) Do non-self-complementary base sequences on a homo-DNA backbone pair with complementary base sequences on a DNA backbone? The example of Fig. 20, specifically designed to test the question, yields an unambiguous 'No'. Whereas the (antiparallel) complementary base sequences (A-A-C-A-T-C-T) and (T-T-G-T-A-G-A) pair cleanly among themselves, when they belong to the same type of backbone (T_m 48° for the ddGlc-pair and 22° for the d-pair at 9 μM), they do not pair when the backbones are not the same, nor does d(A-A-C-A-T-A-C-T) pair with ddGlc(T-T-G-T-A-T-G-A), whose base sequences would be complementary on parallel strand orientation.

Die UV-spektroskopisch gemachten Beobachtungen der Fig. 20 werden durch das in Fig. 21 dokumentierte gel-elektrophoretische Verhalten der Test-Sequenzen (bzw. Sequenz-Gemische) bestätigt. Die beiden (1:1)-Mischungen der antiparallel-komplementären Sequenzen innerhalb der DNS- und der Homo-DNS-Reihe erscheinen als scharfumgrenzte Flecken (Nr. 3 und 7 von l. nach r.), die klar verschieden (d. h. langsamer) wandern als die Flecken der entsprechenden Einzelstränge bzw. Mischkomponenten³³⁾ (Nr. 1 und 2 sowie 4 und 6). Das (1:1)-Homo-DNS/DNS-Hybridisierungsgemisch der entsprechenden (antiparallel-komplementären) Sequenzen wandert nicht als ein Fleck, sondern als zwei Flecken (Nr. 8), deren Lage genau den in die Mischung eingesetzten Komponenten (Nr. 1 und 6) entspricht. Fazit: Zwischen d(A-A-C-A-T-A-C-T) und

³³⁾ Unter den Bedingungen der Gel-Elektrophorese, wo die Oligonucleotide im Vergleich zu den UV-spektroskopischen Bestimmungen bei höherer Eigenkonzentration in verschiedenem Salz-Milieu und bei tiefer Temperatur vorliegen, wandern die Homo-DNS-'Einzelstränge' – im Gegensatz zu den DNS-Einzelsträngen – anscheinend als Selbstpaarungskomplexe. Vgl. auch die Selbstpaarung von ddGlc(A-A-C-A-T-A-C-T) unter den Bedingungen der UV-Spektroskopie (Fussnote 32).

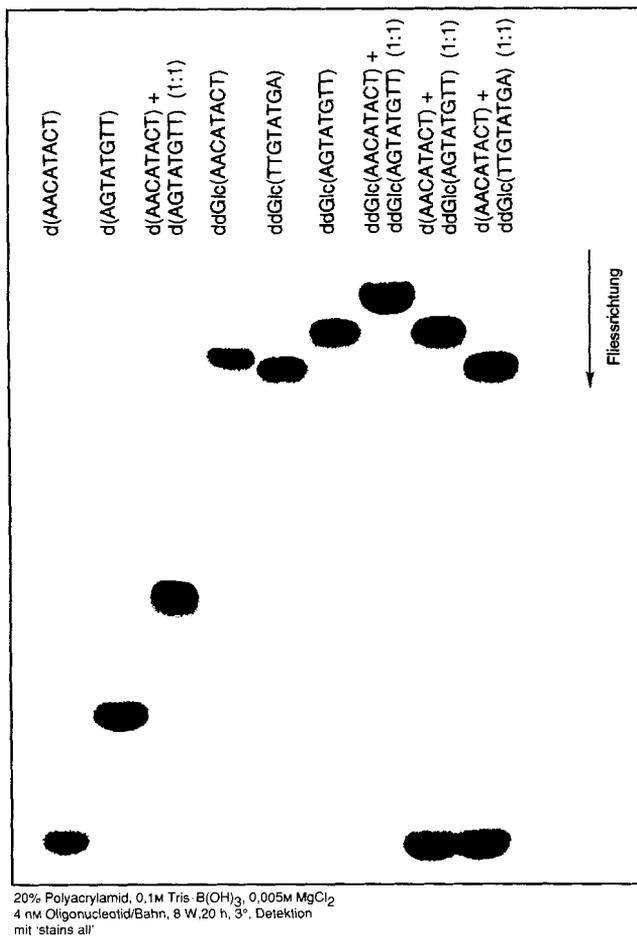


Fig. 21. Experiment zur Frage nach der Kreuzpaarung zwischen ddGlc- und d-Oligonucleotiden: Gel-elektrophoretisches Verhalten*)

- *) Electrophoresis under non-denaturing conditions corroborates the conclusion from Fig. 20: The 1:1 mixtures of d(A-A-C-A-T-A-C-T) with ddGlc(A-G-T-A-T-G-T-T), as well as with ddGlc(T-T-G-T-A-T-G-A), run unambiguously as separated components, whereas the d/d and ddGlc/ddGlc 1:1 mixtures of (antiparallel) complementary oligonucleotides run as duplex spots clearly differentiable from the partner spots. Note the wide difference in mobility of the d and the ddGlc series. The three ddGlc oligonucleotides, when not mixed among themselves, very probably run as self-paired duplexes in the MgCl₂-containing medium (3°). Whereas ddGlc(A-G-T-A-T-G-T-T) does not show a sigmoidal UV-melting curve under standard conditions, ddGlc(A-A-C-A-T-A-C-T) does so with $T_m \approx 20^\circ$ ($c = 8.5 \mu\text{M}$) [7]). Another cross-pairing test was carried out with the sequences referred to in Fig. 4a, b: the UV-hyperchromicity curve of d(A₁₀) does not change upon addition of ddGlc(T₁₀) (not shown; but see [4]).

ddGlc(A-G-T-A-T-G-T-T) findet unter den (nicht-denaturierenden) Bedingungen der Gel-Elektrophorese keine Paarung statt, sehr wohl jedoch paaren unter diesen Bedingungen d(A-A-C-A-T-A-C-T) mit d(A-G-T-A-T-G-T-T) sowie ddGlc(A-A-C-A-T-A-C-T) mit ddGlc(A-G-T-A-T-G-T-T). Der Homo-DNS-Strang ddGlc(T-T-G-T-A-T-G-A) (Nr. 5) verhält sich gegenüber dem *parallel*-komplementären DNS-Strang d(A-A-C-A-T-A-C-T) (Nr. 1) bei der Gel-Elektrophorese als ebenfalls nicht-hybridisch-paarend (Nr. 9).

Vorgängig zum oben besprochenen Kreuzungsexperiment hatten wir ein solches mit einem ausschliesslich A- und T-haltigen Oligonucleotid-Paar durchgeführt; auch dieses Experiment hatte das Nichteintreten einer hybridischen Basenpaarung zwischen Homo-DNS- und DNS-Strängen angezeigt. Das Experiment war in das in *Fig. 4b* besprochene einbezogen und hatte darin bestanden, dass man UV-spektroskopisch die Temperatur-Abhängigkeit der Hyperchromizität des DNS-Einzelstrangs $d(A_{10})$ nach Zugabe einer äquimolaren Menge des Homo-DNS-Einzelstrangs ddGlc(T_{10}) prüfte. Durch diese Zugabe änderte sich im wesentlichen nichts an der Hyperchromizitätskurve (vgl. [4], S. 119), ganz im Gegensatz zu dem in *Fig. 4b* dokumentierten Experiment, in welchem die Zugabe einer äquimolaren Menge $d(T_{10})$ die linear ansteigende Hyperchromizitätskurve von $d(A_{10})$ in die sigmaoide Schmelz-Kurve des ($d(A_{10})/d(T_{10})$)-Duplexes umwandelt. Es ist in diesem Zusammenhang der Erwähnung wert, dass ein analoger Hybridpaarungstest mit ddGlc(A_{10}) und $d(T_{10})$ nicht signifikant wäre, da ddGlc(A_{10}) (im Gegensatz zu $d(A_{10})$) eine starke Selbstpaarung eingeht.

3. Zur Konstitution der Basenpaarungen in der Homo-DNS-Reihe. – Im vorstehenden Kapitel haben wir uns auf die Wiedergabe und Erörterung der empirischen Beobachtungen und Ermittlungen zum Paarungsverhalten von Homo-DNS-Oligonucleotid-Strängen beschränkt und die Unterschiede zum Verhalten entsprechender Oligonucleotide der DNS-Reihe herausgearbeitet. In diesem Kapitel befassen wir uns mit der Frage nach der Konstitutionszuordnung für die in der Homo-DNS-Reihe mit den vier (bzw. fünf) konventionellen Basen beobachteten und vorstehend behandelten Basenpaarungen. Die Ausführungen betreffen dabei in erster Linie die Ableitung des *Konstitutionstyps*, wie er sich aus den Ergebnissen der bisher besprochenen, gezielt auf die Konstitutionsfrage hin angelegten Paarungsexperimenten ergibt; sie behandeln aber auch zusätzliche, aus der Konstitutionsfrage hervorgegangene Experimente chemischer und spektroskopischer Art, deren Ergebnisse für getroffene Konstitutionszuordnungen mitentscheidend waren. Mit der Dokumentation und Erörterung der in diesem Zusammenhang durchgeführten NMR-spektroskopischen Untersuchungen gehen wir in diesem Teil der Reihe nur soweit, als dies für die Herleitung des Konstitutionstyps der einzelnen Basenpaarungen notwendig ist; eine im heutigen Sinne zunftgerechte, auf die Ermittlung der konformationellen Aspekte der Struktur hinzielende NMR-Analyse eines Homo-DNS-Duplexes ist Gegenstand des Teils IV dieser Reihe [12].

Die hier darzulegenden Herleitungen des Konstitutionstyps von Basenpaarungen aus dem Paarungsverhalten spezifisch für die Konstitutionsfrage entworfener Basensequenzen gehen von dem arbeitshypothetischen Postulat aus, dass es einen *bevorzugten* Konstitutionstyp der Paarung zwischen zwei gegebenen Basen gibt und dass dieser Konstitutionstyp nicht wesentlich von der *Basenpaar-Sequenz* abhängt, d. h. z. B. der für den Duplex von ddGlc(A_5-T_5) abgeleitete (A-T)-Paarungskonstitutionstyp auch für den Du-

plex von $\text{ddGlc}((\text{A-T})_n)$ gilt. Unsere bisherigen Erfahrungen – d. h. die Kohärenz einer grossen Anzahl experimenteller Beobachtungen und deren auf erwähnter Grundlage vorgenommenen Interpretation – weisen darauf hin, dass dieses Postulat in der Homo-DNS-Reihe zurecht besteht. Dennoch sind die Darlegungen über die Konstitution der Basenpaarungen in der Homo-DNS-Reihe gerade auch wegen dieses Postulats so lange mit problemgerechtem Vorbehalt aufzunehmen, als sie nicht durch Röntgenstruktur-Analysen bestätigt sind.

3.1. Konstitution der (Purin-Pyrimidin)-Paarungen. Das Paarungsverhalten in der Homo-DNS-Reihe ist in sowohl quantitativer als auch qualitativer Hinsicht von jenem in der DNS-Reihe so stark verschieden, dass nicht von vornherein von der Annahme auszugehen war, die konventionellen (Purin-Pyrimidin)-Paarungen würden dem von der DNS-Reihe her bekannten *Watson-Crickschen* Konstitutionstyp angehören. Indem unsere Beobachtungen über das Paarungsverhalten von Homo-DNS-Oligonucleotiden sukzessive zeigten, dass die *Watson-Crickschen* Paarungsregeln für die DNS nicht nur eine Konsequenz der Eigenschaften der Basen, sondern ebenso sehr eine solche der spezifischen Furanose-Struktur des Zucker-Bausteins des Rückgrats darstellen, hatten somit Fragen offenzubleiben wie z. B. die, ob in der Homo-DNS-Reihe nicht etwa der *Hoogsteen*-Paarungsmodus gegenüber dem *Watson-Crick*-Modus für die (Adenin-Thymin)-Paarung bevorzugt sein könnte. Die vermutete Existenz einer für die Homo-DNS-Reihe spezifischen (Adenin-Cytosin)-Paarung betont die Berechtigung solcher Vorsicht. Die nachstehenden drei Abschnitte legen dar, wie weit wir zur Zeit die Fragen über die Konstitution der (Purin-Pyrimidin)-Paarungen in der Homo-DNS-Reihe beantworten können.

3.1.1. Adenin und Thymin paaren auch in der Homo-DNS-Reihe bevorzugt nach dem Watson-Crick-Modus. In *Schema 6* sind die insgesamt 16 topischen Varianten zusammengestellt, nach welchen (grundsätzlich) eine (A/T)-Paarung innerhalb eines Oligonucleotid-Duplexes erfolgen kann³⁴). Die 16 Varianten ergeben sich aus drei Variablen: erstens, dem *Paarungs-Konstitutionstyp*, für den aus Struktur- und Reaktivitätsgründen (bei Ausschluss von instabilen Adenin- und Thymin-Tautomeren) insgesamt vier Varianten in Frage kommen (*Watson-Crick*, 'reverse'-*Watson-Crick*, *Hoogsteen* und 'reverse'-*Hoogsteen*; vgl. *Schema 7*), zweitens, der *Strang-Orientierung*, gemäss welcher die beiden Oligonucleotid-Stränge im Duplex konstitutionell parallel oder antiparallel angeordnet sein können, und drittens, der *Konformation der Basen-Zucker-Verknüpfung*, die entweder dem *anti*- oder *syn*-Typ (vgl. *Schema 6*, unten) entsprechen kann. Der Paarungs-Konstitutionstyp ist hier deshalb mit den beiden andern Variablen in Relation gesetzt, weil diese experimentell leicht beobachtbar sind (vgl. *Schema 7* für die (*anti/syn*)-Dichotomie und *Kap. 2.6* für die Strang-Orientierung) und mit dem Paarungskonstitutionstyp eindeutig korrelieren.

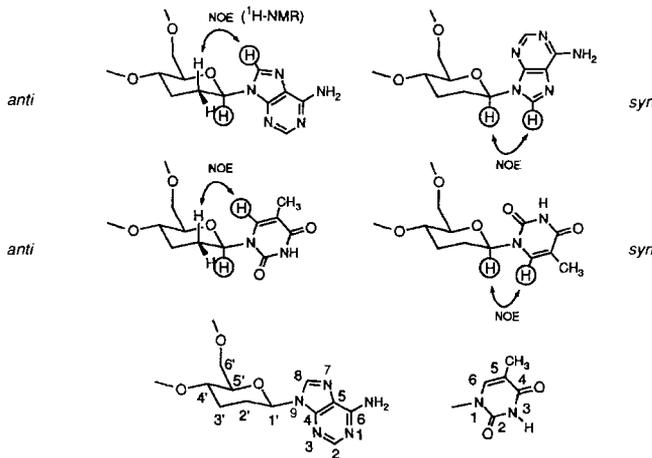
Im voranstehenden Kapitel (vgl. *Kap. 2.6*) ist nachgewiesen worden, dass (die dort behandelten) (Purin-Pyrimidin)- (insbesondere auch Adenin-Thymin)-gepaarten Homo-DNS-Oligonucleotide antiparallele Strang-Anordnung bevorzugen, und im Teil IV dieser Reihe [12] wird ¹H-NMR-spektroskopisch dokumentiert werden, dass im Paarungs-

³⁴) Über Definition und Nomenklatur von Oligonucleotid-Paarungsparametern und ihre Rolle in der Chemie der Oligonucleotide der natürlichen Reihe, vgl. (z. B.) [15].

Schema 6. Beziehungen zwischen Paarungsmodus, Basenkonformation und Strang-Orientierung*)

<i>Watson-Crick</i>	<i>anti</i> <i>anti</i> antiparallel	<i>syn</i> <i>anti</i> parallel	<i>anti</i> <i>syn</i> parallel	<i>syn</i> <i>syn</i> antiparallel
reverse <i>Watson-Crick</i>	<i>anti</i> <i>anti</i> parallel	<i>syn</i> <i>anti</i> antiparallel	<i>anti</i> <i>syn</i> antiparallel	<i>syn</i> <i>syn</i> parallel
<i>Hoogsteen</i>	<i>anti</i> <i>anti</i> parallel	<i>syn</i> <i>anti</i> antiparallel	<i>anti</i> <i>syn</i> antiparallel	<i>syn</i> <i>syn</i> parallel
reverse <i>Hoogsteen</i>	<i>anti</i> <i>anti</i> antiparallel	<i>syn</i> <i>anti</i> parallel	<i>anti</i> <i>syn</i> parallel	<i>syn</i> <i>syn</i> antiparallel

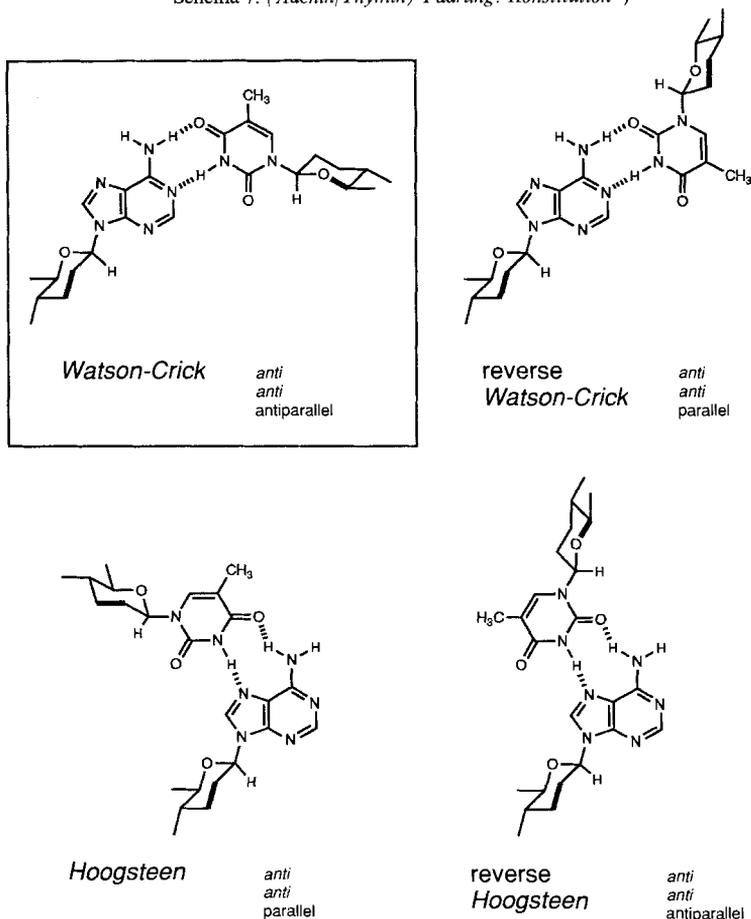
Konstitutionstyp der Paarung *anti/syn* : Konformationstyp der Basen-Pyranose-Verknüpfungen
anti/syn
antiparallel/parallel: Strang-Orientierung



*) Relationships among the constitutional type of base pairing ('pairing mode'), the conformational type at the nucleosidic bond (*anti* or *syn*), and the strand orientation (antiparallel or parallel). For the constitutional details of the four pairing modes in the case of specific base pairs, see the relevant schemes below.

komplex von ddGlc(A₅-T₅) sowohl die Adenine als auch die Thyminen in *anti*-Konformation vorliegen. Unterstellt man die Zulässigkeit der Verallgemeinerung dieser Befunde auf Homo-DNS-(Adenin/Thymin)-Paarungen generell, so entfallen von den in *Schema 6* aufgeführten 16 Varianten sämtliche bis auf deren zwei, nämlich der Konstitutionstyp der antiparallelen *Watson-Crick*-Paarung mit *anti-anti*-Konformation der Basen, und der Typ der antiparallelen 'reverse'-*Hoogsteen*-Paarung mit ebenfalls *anti-anti*-Konformation der Basen (*Schema 7*). Die übliche [32] Entscheidung zwischen diesen beiden Paarungstypen bestünde in der ¹H-NMR-spektroskopischen Beobachtung eines NOE zwischen dem als H-Brücke agierenden Imino-Proton des Thymins und dem in der *Watson-Crick*-Paarung unmittelbar benachbarten (in der 'reverse'-*Hoogsteen*-Paarung jedoch weitab liegenden) C(2)-Proton des Adenin-Kerns (vgl. *Schema 6*). Wie bei der Beschrei-

Schema 7. (Adenin/Thymin)-Paarung: Konstitution*)

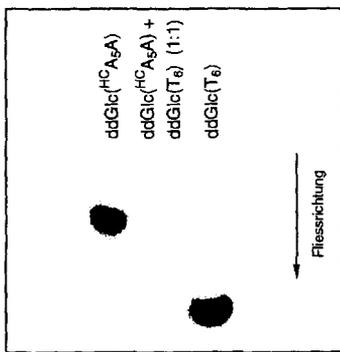
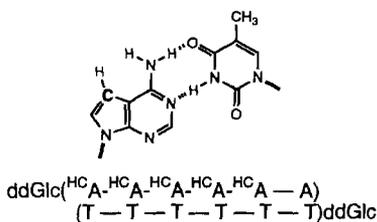


*) Among the four chemically feasible modes for adenine-thymine pairing, it is the *Watson-Crick* mode that prevails in duplexes of homo-DNA oligonucleotides. Both bases in the (antiparallel) duplex of ddGlc(A₅-T₃) have *anti*-conformation (see Part IV [12]). The formally allowed *reverse-Hoogsteen* alternative is excluded by NMR observations [12] and is contradicted by the observations of Fig. 22 as well.

bung der ¹H-NMR-Strukturanalyse von ddGlc(A₅-T₃) darzulegen sein wird [12], versagt dieses Vorgehen in der Homo-DNS-Reihe infolge zu raschen Austausches des Imino-Protons mit dem Lösungsmittel H₂O. Die Entscheidung, dass der ddGlc(A₅-T₃)-Duplex in der Tat *Watson-Crick*- (und nicht '*reverse-Hoogsteen*)-Paarung aufweist, beruht auf der ¹H-NMR-spektroskopischen Beobachtung *Watson-Crick*-spezifischer Interstrang-NOE's durch *Otting* und *Wüthrich* [12]; dies wird im Teil IV der Reihe im Detail dokumentiert.

Die am Duplex von ddGlc(A₅-T₃) ¹H-NMR-spektroskopisch beigebrachten Gründe zugunsten des *Watson-Crick*-schen Paarungstyps stehen in Übereinstimmung mit einer ganzen Reihe auf *chemischem* Wege gewonnener Beobachtungen und Argumente zur

Konstitution der (A/T)-Paarung. Die von der NMR-Studie unabhängigen Argumente sind vor allem im Hinblick auf die Frage nach der Gültigkeit des Postulats von Belang, wonach ein in einer gegebenen Duplex-Basenpaarsequenz als bevorzugt erkannter Paarungstyp auch bei anderen Basenpaar-Sequenzen der bevorzugte sein soll. Ein in diesem Zusammenhang wichtiges, auf chemischem Wege erbrachtes Ergebnis ist die antiparallele Strang-Orientierung, denn die Beobachtung der Gegenläufigkeit der Basensequenz-Komplementarität ist für eine breit gestreute Palette unterschiedlicher Basenpaar-Sequenzen gemacht worden (Kap. 2). Vor allem aber ist auf chemischem Wege für den Duplex-Typ $ddGlc(A_n)/ddGlc(T_n)$ nachgewiesen, dass der *Watson-Crick*-Typ der (A/T)-



20% Polyacrylamid, 0,09M Tris B(OH)₃, 0,05M MgCl₂
 4 nM Oligonucleotid/Bahn, 7 W, 15 h, RT, Detektion
 mit 'stains all'

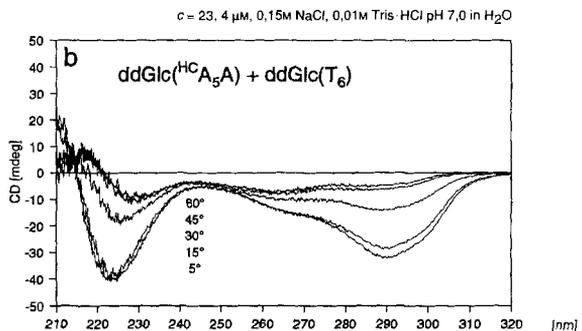
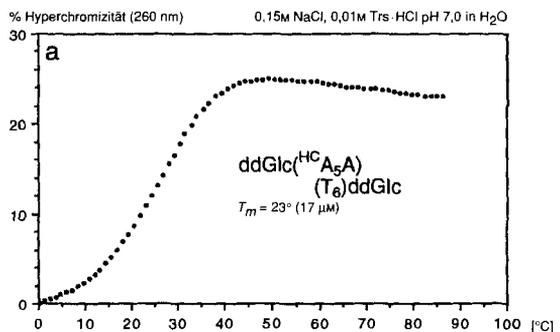


Fig. 22. (Adenin/Thymin)-Paarung: Markierungsexperiment mit 7-Carbaadenin*)

*) $ddGlc(^{7CH}A_5-A)$, in which five adenine nuclei are replaced by the 7-carbaadenine nucleus, is observed to undergo normal purine-pyrimidine pairing with $ddGlc(T_6)$, to form a complex, the temperature-dependent CD spectra of which show a characteristic similarity to those for adenine-thymine paired $ddGlc$ -duplexes (see Fig. 8). Note that such a complex can only pair in the *Watson-Crick* and not in the *reverse-Hoogsteen* mode (see also comments to Fig. 25, below).

Paarung im Homo-DNS-System räumlich zwangslos realisierbar ist. Fig. 22 illustriert das hierzu durchgeführte Experiment. Dieses macht von der generellen Möglichkeit Gebrauch, das Potential einer adenin-haltigen Oligonucleotid-Kette zur *Hoogsteen*-Paarung dadurch selektiv zu eliminieren, dass man bei der Synthese des Oligonucleotid-Strangs den Adenin-Baustein systematisch durch 7-Carbaadenin [33] ersetzt. Das als

Einzelstrang existierende Hexanucleotid $\text{ddGlc}(\text{}^{\text{H}}\text{C}_5\text{-A})^{35}$, in welchem fünf der Adenine je durch ein 7-Carbaadenin ersetzt sind, bildet zusammen mit dem Einzelstrang $\text{ddGlc}(\text{T}_6)$ einen durch seine sigmaoide Schmelz-Kurve (Fig. 22), sein temperatur-abhängiges CD-Spektrum (Fig. 22b) sowie sein gel-elektrophoretisches Verhalten (Fig. 22) klar erkennbaren Paarungskomplex³⁶). Dieser kann nur ein *Watson-Crick*- (oder 'reverse'-*Watson-Crick*)-Duplex sein. Sein CD-Spektrum ist den CD-Spektren normaler (A/T)-gepaarter Duplexe der Homo-DNS-Reihe (vgl. Fig. 8) sehr ähnlich.

Tab. 2 erinnert an die relativen Stabilitäten der Paarungskomplexe der vier bislang hergestellten Homo-DNS-Oligonucleotide, die sämtliche vier kanonischen Basen enthalten und in deren Duplexen die zwei (Purin-Pyrimidin)-Paare in variierender Basenpaar-Sequenz vorkommen. Solche Duplexe haben einen einheitlichen Paarungstyp zu betätigen, denn *Watson-Crick*- und 'reverse'-*Hoogsteen*-Paarung weisen (vgl. Schema 7) eine räumlich drastisch verschiedene Ausrichtung der Basenverankerungs-Bindungsachsen relativ zueinander auf. Das Argument nimmt die im Kap. 3.1.2 begründete Zuordnung vorweg, wonach die (G/C)-Paarung in Homo-DNS-Oligonucleotiden nach dem *Watson-Crick*-Typ erfolgt. Sterische Verankerungsprobleme würden übrigens auch dann auftreten, wenn in einem Duplex nur Adenine und Thymin alternierten, diese aber miteinander nach dem 'reverse'-*Hoogsteen*-Typ (bei gleichbleibender Basenkonformation) gepaart zu sein hätten.

Tab. 2. Räumliche Kompatibilität der (Adenin/Thymin)- mit der (Guanin/Cytosin)-Paarung*)

	T_m [°C]	ΔG (25°) [kcal/mol]
$\text{ddGlc}(\text{A-A-C-T-A-C-T})$ (T-T-G-A-T-G-A) ddGlc	42 (10 μM)	–
$\text{ddGlc}(\text{A-A-C-A-T-A-C-T})$ (T-T-G-T-A-T-G-A) ddGlc	48 (9 μM)	–10,3
$\text{ddGlc}(\text{C-G-A-A-T-T-C-G})$ (G-C-T-T-A-A-G-C) ddGlc selbstkomplementär	51 (10 μM)	–10,6
$\text{ddGlc}(\text{C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G})$ (G-C-G-C-T-T-A-A-G-C-G-C) ddGlc selbstkomplementär	86 (10 μM)	–14,8

*) Adenine-thymine pairing in homo-DNA duplexes containing all of the four canonical bases must be assumed to be stereochemically compatible with guanine-cytosine pairing, as judged from the relative stabilities of the four duplexes presented above.

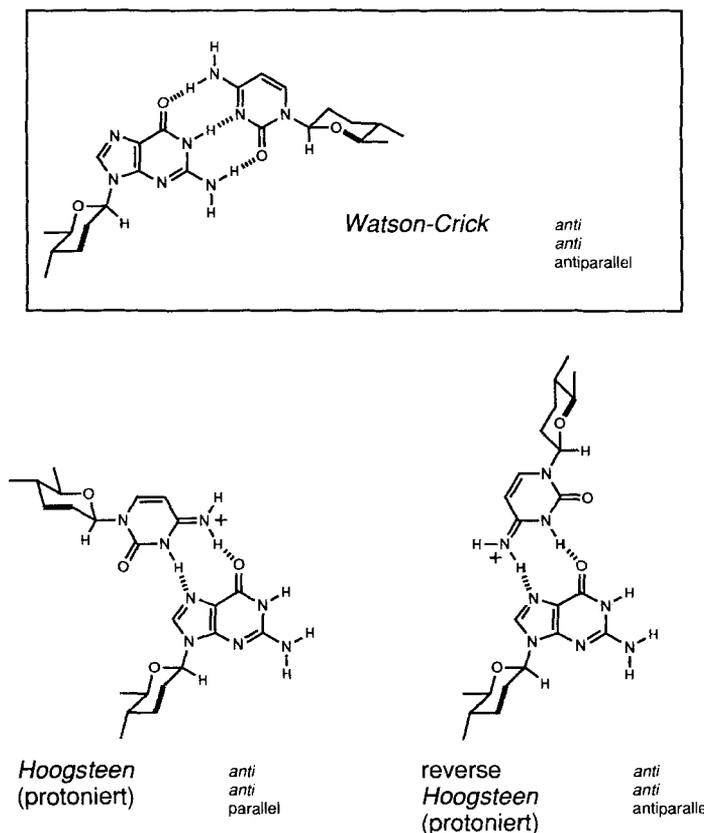
Entsprechung vs. Nicht-Entsprechung der Basenverankerungs-Geometrie bei (Purin-Pyrimidin)-Alternanz bei gleichbleibender Konformation der Basenverknüpfung ist ein bedeutender (wenn nicht gar der bedeutendste) Unterschied, der zwischen dem *Watson-Crick*- und 'reverse'-*Hoogsteen*-Paarungstyp besteht. Da dieser Aspekt besonders auch bei der (Purin-Purin)-Paarung in der Homo-DNS-Reihe eine Rolle spielt, wird er im Kap. 4 gesondert abgehandelt.

³⁵) Zur Herstellung vgl. [2]. Das Hexamer $\text{ddGlc}(\text{}^{\text{H}}\text{C}_5\text{-A})$ wurde im Zusammenhang mit dem (Adenin-Adenin)-Paarungsproblem hergestellt, vgl. Kap. 3.2.1; dort wird in Fig. 25 auch dokumentiert, dass das Oligonucleotid keine Selbstpaarung zeigt.

³⁶) *Pro memoria*: das normale Hexamer $\text{ddGlc}(\text{A}_6)$ bildet mit $\text{ddGlc}(\text{T}_6)$ keinen Paarungskomplex, weil ersteres mit sich selbst paart, vgl. Kap. 2.2.

3.1.2. Die (Guanin/Cytosin)-Paarung erfolgt nach dem Watson-Crick-Modus. Ähnlich wie in der DNS-Reihe ist auch in der Homo-DNS-Reihe die (G/C)-Paarung enthalpisch viel stärker als die (A/T)-Paarung. Schon allein diese Tatsache lässt in Anbetracht der spezifischen Dreizähigkeit der Watson-Crick-Paarung beim (G/C)-Paar kaum Zweifel über den Paarungsmodus offen. Während für den Watson-Crick-Modus keine konstitutionell vernünftige 'reverse'-Alternative zu erkennen ist, bedarf ein von Triplexen der DNS-Reihe her bekannter (C/G)-Hoogsteen-Paarungstyp [34] deswegen einer Prüfung, weil er eine Protonierung des Cytosin (oder Guanin)-Kerns voraussetzt, dadurch innerhalb eines Paarungskomplexes positive Ladungen im Umfeld der Phosphat-Gruppen und somit eine Situation schafft, die bei einer gegenüber der DNS räumlich so unterschiedlichen Basenverankerung in Homo-DNS-Duplexen nicht von vornherein abgetan werden darf. Infolge der Antiparallelität der (G/C)-Paarung (vgl. Kap. 2.6) käme indessen nur die 'reverse'-Hoogsteen-Alternative in Frage (vgl. Schema 8). Das Vorliegen einer solchen

Schema 8. (Guanin/Cytosin)-Paarung: Konstitution*)



*) The only chemically feasible alternatives to the conventional Watson-Crick mode of guanine-cytosine pairing would be the Hoogsteen- and the reverse-Hoogsteen-modes, both of which, however, would require an additional proton per pairing unit. Both modes are excluded by the observation that the strength of the guanine-cytosine pairing in two test examples (see below) is not increased by lowering the pH.

liesse sich experimentell dadurch erkennen, dass die Stabilität eines auf diesem Interaktionstyp beruhenden Paarungskomplexes entlang einer Reihe fallender pH-Werte der Lösung zuzunehmen hätte [34]. Wir haben dies für den Paarungskomplex des repräsentativen Hexanucleotids $\text{ddGlc}((\text{G-C})_3)$ nachgeprüft und festgestellt, dass die Schmelz-Temperatur innerhalb des signifikanten pH-Bereichs bei fallendem pH-Wert nicht steigt, sondern tendenziell fällt (Fig. 23). Auch der Paarungskomplex des Dodecamers $\text{ddGlc}(\text{C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G})$ schmilz bei pH 4 tiefer als bei pH 7³⁷⁾. Diese Beobachtungen schliessen den 'reverse'-Hoogsteen-Typ für die (G/C)-Paarung aus. Sie und alle in den Kap. 2.4, 2.6 und 2.7 besprochenen experimentellen Ergebnisse stehen im Einklang mit der durch intrinsische chemische Plausibilität nahegelegten (letztlich aber experimentell bislang nicht eigentlich bewiesenen) Auffassung, dass die (G/C)-Paarung in der Homo-DNS-Reihe die normale dreizählige Watson-Crick-Paarung ist.

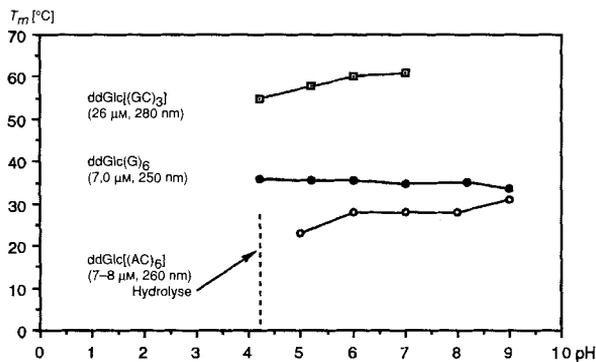


Fig. 23. Prüfung der pH-Abhängigkeit von Paarungen*)

- *) Is the stability of ddGlc duplexes based on guanine-cytosine, adenine-cytosine, or guanine-guanine pairing increased by lowering the pH (protonating one of the base partners)? In the two of the three test examples in which an effect is observed at all, it runs in the opposite direction. The same is true for the duplex of $\text{ddGlc}(\text{C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G})$ [35]. That this kind of test can be meaningful is seen in the allopyranosyl-(4'→6')-oligonucleotide series [36], where guanine-cytosine pairing is found to be strengthened efficiently by protonation.

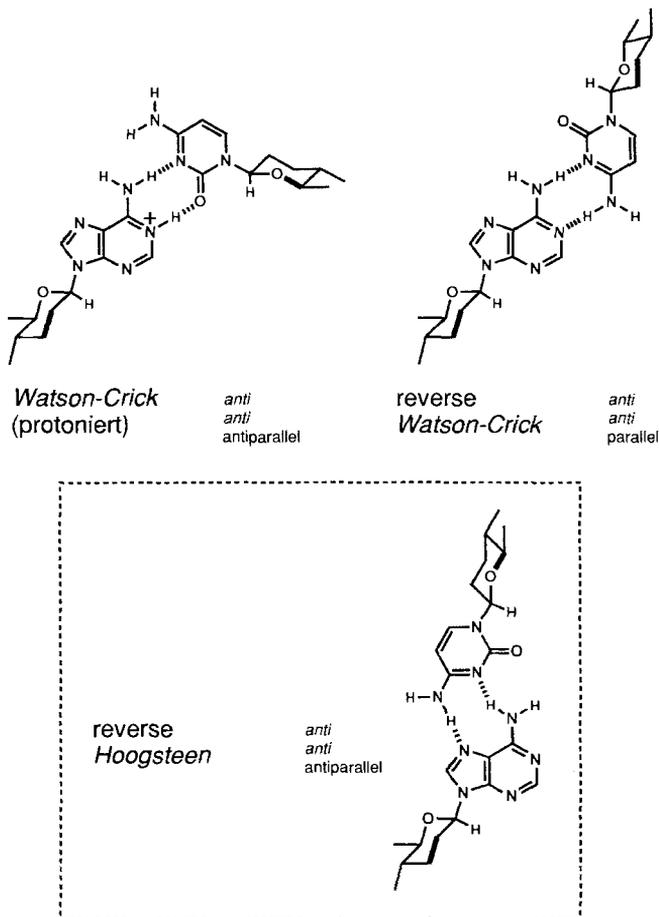
3.1.3. Zur Frage der (Adenin/Cytosin)-Paarung. In allen im Kap. 2 beschriebenen, gezielt auf den Nachweis der Existenz spezifischer Basenpaarungen ausgerichteten Experimenten konnte jeweils das Vorkommen einer gegebenen Basenpaarung experimentell eindeutig belegt oder widerlegt werden, mit der einzigen Ausnahme der (A/C)-Paarung. Die bislang durchgeführten Experimente reichen nicht aus, um die Alternative rigoros auszuschliessen, dass die bei Homo-DNS-Oligonucleotiden des Typs $\text{ddGlc}((\text{A-C})_n)$ und $\text{ddGlc}((\text{C-A})_n)$ ($n = 4-6$) beobachtete (relativ schwache) Komplexierung durch eine inter-

³⁷⁾ Dass ein solcher Stabilitätstest (T_m in Abhängigkeit zum pH-Wert) in der Chemie der Hexose-Oligonucleotide signifikant sein kann, zeigen insbesondere von Fischer und Helg [35] [36] in der Reihe der β -D-Allopyranosyl-Oligonucleotide gemachte Beobachtungen; dort steigt die Stabilität von (G-C)-Paarungskomplexen mit fallendem pH-Wert drastisch an.

mittierende (A-A)-Paarung zwischen antiparallel orientierten, um eine Baseneinheit gegeneinander verschobenen Strängen zustande kommen könnte. Titel und nachstehende Bemerkungen zum Konstitutionstyp einer (gegebenenfalls in der Homo-DNS-Reihe existenten) (A-C)-Paarung sind deshalb betont im Konjunktiv gehalten.

Für eine (A-C)-Paarung kämen von den konstitutionellen Gegebenheiten her an sich die drei in *Schema 9* wiedergegebenen Konstitutionstypen in Frage. Von diesen kann man den *Watson-Crick*-Typ ausschliessen, da er eine Protonierung des Adenin-Kerns voraussetzt [37]. Eine solche steht im klaren Gegensatz zum Ergebnis des gezielt in diesem Zusammenhang angestellten Experiments, wonach die Schmelz-Temperaturen des ddGlc((A-C)₆)-Paarungskomplexes mit fallendem pH-Wert der Lösung nicht steigen,

Schema 9. (*Adenin/Cytosin*)-Paarung: Konstitution*)



*) Since the stability of duplex ddGlc((A-C)₆) is not raised by lowering the pH of the solution (see *Fig. 23*), and since self-pairing is no longer observed when the adenine in ddGlc((A-C)₆) is replaced by 7-carbaadenine (see [7], p. 102), the only option for the mode of an adenine-cytosine pairing would be reverse-*Hoogsteen*.

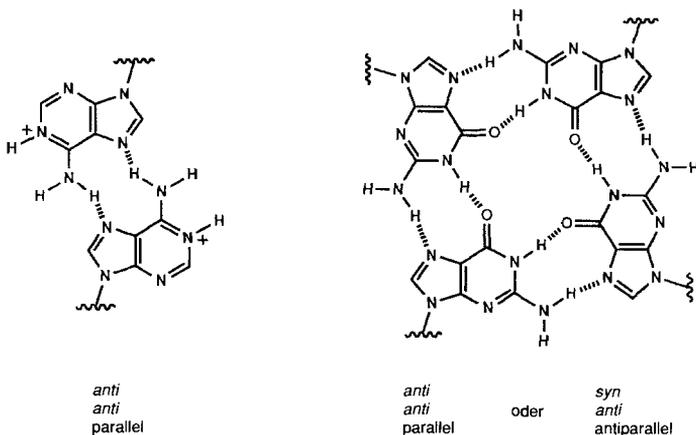
sondern fallen (vgl. *Fig. 23*). Des weiteren haben wir festgestellt, dass das Selbstpaarungsvermögen von $\text{ddGlc}((\text{A-C})_6)$ völlig verschwindet, wenn anstelle des Adenins das 7-Carbaadenin in die Oligonucleotid-Kette eingebaut ist (Einzelheiten vgl. [7]). Dies schliesst zusätzlich die Variante der 'reverse'-*Watson-Crick*-Paarung aus, würde indessen in Übereinstimmung mit dem einzig noch verbleibenden Modus der 'reverse'-*Hoogsteen*-Paarung stehen. Leider gilt solche Übereinstimmung auch für das Alternativ-Modell einer intermittierenden (A/A)-Paarung in gegeneinander verschobenen, antiparallel orientierten Strängen (vgl. *Kap. 3.2.1* und *Schema 2*).

3.2. Konstitution der (Purin-Purin)-Paarungen. Wie eingangs erwähnt, beschränken wir uns in dieser Arbeit auf (Purin-Purin)-Paarungen des Adenins und Guanins. Bislang wurden mit diesen beiden Purin-Basen nur Homo-(Purin-Purin)-Paarungen festgestellt. Eine an sich denkbare Hetero-(Purin-Purin)-Paarung zwischen den beiden Purin-Basen konnte bislang nicht explizite beobachtet werden, d.h. bei jenen Homo-DNS-Oligonucleotiden, wo sie an sich auftreten könnte, scheint sie durch die offenbar stärkeren Homo-(Purin-Purin)-Paarungen Adenin-Adenin sowie Guanin-Guanin überdeckt zu werden. Die als Teil V dieser Reihe vorgesehene Arbeit [14] wird den Homo-(Purin-Purin)-Paarungen des Isoguanins und 2,6-Diaminopurins [13] sowie vor allem den Hetero-(Purin-Purin)-Paarungen des Isoguanins mit Guanin [13] und des 2,6-Diaminopurins mit Xanthin [13a] gewidmet sein³⁸). Die Paarungseigenschaften des Hypoxanthins [8] wurden indessen im Zusammenhang mit dem Problem der Konstitutionszuordnung der (A/A)-Paarung überprüft und die dabei gemachten Beobachtungen sind deshalb nachstehend im *Kap. 3.2.1* behandelt.

Wie in den *Kap. 2.1, 2.3* und *2.6* dargelegt wurde, ist das Auftreten von stabilen, spektroskopisch scharf erfassbaren Paarungskomplexen von Oligonucleotiden kleiner Oligomerisationszahl, die nur die Purin-Basen Adenin und (oder) Guanin enthalten, ein für den Struktur-Typ der Homo-DNS-spezifisches Phänomen. Zur Zeit, da wir erstmals das Phänomen der (A/A)-Paarung am Homo-DNS-Oligonucleotid $\text{ddGlc}(\text{A}_6)$ feststellten (Mai 1988 [4]), hatte die DNS-Literatur zwar Erörterungen klassifikatorischer Natur [38] und theoretische Berechnungen [39] über konstitutionelle Möglichkeiten einer Paarung zwischen beidseitig neutralen Adenin-Kernen enthalten, jedoch keinerlei experimentelle Hinweise über ein Vorkommen eines solchen Paarungstyps bei natürlichen Nucleinsäuren oder DNS-Oligonucleotiden. Hingegen wusste man seit langem von der Polyadenylsäure, dass sie, zwar nicht unter neutralen, aber unter *protonierenden* Bedingungen geordnete Doppelhelices bildet, die durch Paarung von neutralen, mit *N*-protonierten (bzw. von beidseitig *N*-protonierten) Adenin-Kernen zusammengehalten werden [17] [40]. Auch über homopurinische (G-G)-Sequenzen in der DNS-Reihe existierten bereits zahlreiche Beobachtungen, aus welchen die Vorstellung von einer (G/G)-Paarung des *Hoogsteen*-Typs hervorgegangen war, welche den Struktur-Typ einer sog. Guanin-Tetrade in einem Quadruplex (bzw. einem Quadruplex-Bezirk) zu bilden vermag [41]; eine Vorstellung, welche erst kürzlich röntgenstrukturanalytisch und NMR-spektroskopisch belegt werden konnte [25]. *Schema 10* ruft im Hinblick auf die nachstehenden Erörterungen den Konstitutionstyp der beiden klassischen (Purin-Purin)-Paarungstypen der natürlichen Reihe in Erinnerung. In allerjüngster Zeit häufen sich Veröffentlichun-

³⁸) Für eine vorläufige Orientierung über die Homo- sowie Hetero-(Purin-Purin)-Paarungen dieser Basen vgl. [3].

Schema 10. (Purin/Purin)-Paarungen in der natürlichen Reihe *)



Konstitutionstyp der (A^+ - A^+)-Paarung in der Polyadenylsäure-Doppelhelix in saurer Lösung (hypothetisch), nach [40]

Konstitutionstyp der Guanin-Tetrade homopurinischer d(G_n)-Sequenzen bzw. Sequenzbereiche, nach [41] [25]

- *) Duplex formation based on purine-purine pairing under neutral conditions is a specific behavioral feature of oligonucleotides in the homo-DNA series. In the DNA series, guanine-guanine pairing of a different sort has long been known [41], and the legendary guanine tetrade structure motif (right-hand formula) has recently found its confirmation by X-ray- and NMR-studies [25]. Until very recently, adenine-adenine pairing in the DNA series has been confined to cases in which protonated adenine nuclei interact with each other in the manner proposed for the double helix of polyadenylic acid (left-hand formula) [17] [40]. Recently, the constitutional type of adenine-adenine and guanine-guanine pairing, found to be so prominent in the homo-DNA series, has been recognized as present also in the DNA series – so far confined, however, to purine-purine-pyrimidine triplexes [42].

gen, in welchen homopurinische (A/A)- sowie (G/G)-Paarungen in DNS-Triplex-Bezirken involviert sind [42]; wir werden darauf weiter unten im Zusammenhang mit der zusammenfassenden Diskussion der homopurinischen Paarungen der Homo-DNS-Reihe zurückkommen.

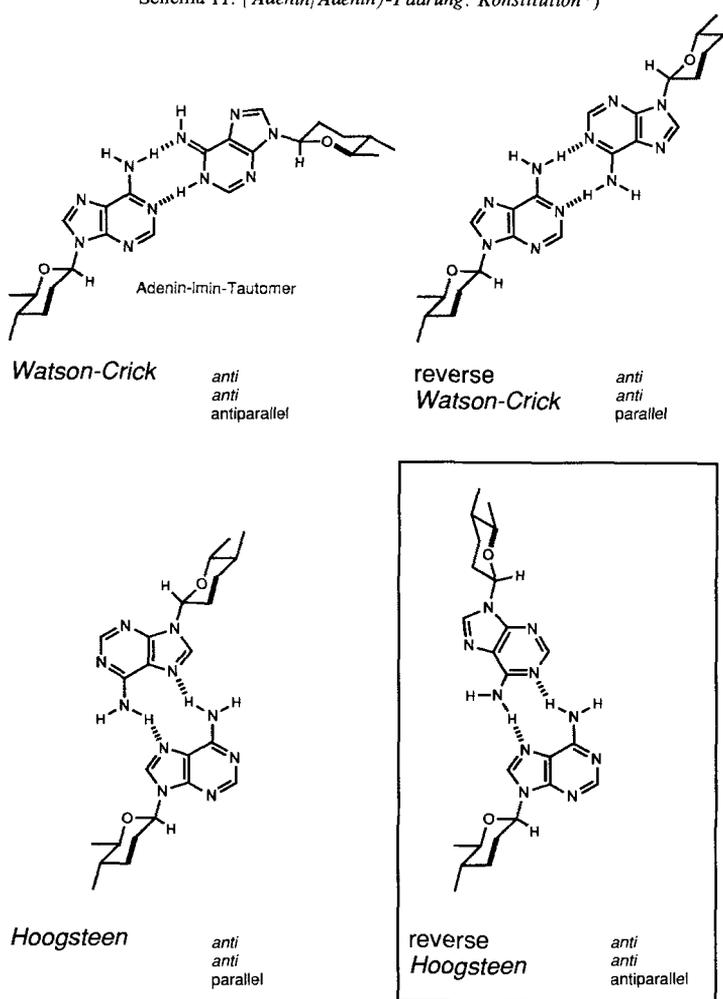
3.2.1. Die (Adenin/Adenin)-Paarung erfolgt nach dem 'reverse'-Hoogsteen-Modus. Die Ermittlung des Konstitutionstyps der neuartigen (A/A)-Paarung in Homo-DNS-Oligonucleotiden erwies sich im Laufe der Untersuchungen als eines unserer zentralen Probleme. Es gelang (vorerst) nicht, von Oligonucleotiden des Typs ddGlc(A_n) zur Röntgenstruktur-Analyse geeignete Kristalle zu erhalten³⁹⁾. Zudem zeigte es sich, dass bei der NMR-Spektroskopie von Homo-DNS-Oligonucleotiden im Unterschied zu Oligonucleotiden der natürlichen Reihe infolge zu raschen Austauschs mit dem Lösungsmittel (normalerweise) keine NOE's mit den Amino- und Imino-Protonen beobachtet werden können, womit die Möglichkeit einer direkten NMR-spektroskopischen Beobachtung

³⁹⁾ Inzwischen ist es in unserem Laboratorium Ling Peng gelungen, solche Kristalle von dem bei 43° schmelzenden ($c = 17,8 \mu\text{M}$) Paarungskomplex der Sequenz ddGlc(C-G-A-A-A-A-C-G) zu erhalten.

des Konstitutionstyps der (A/A)-Paarung entfiel (vgl. *Kap. 3.2.3* und insbesondere Teil IV [12]). Es wurde deshalb versucht, mit NMR-spektroskopisch zugänglicher Teil-Information und mit vorwiegend chemischen Methoden und Argumenten die Konstitutionsfrage anzugehen. Zur Schlussfolgerung, wonach von den vier aus chemischer Sicht für die (A/A)-Paarung in Betracht zu ziehenden Konstitutionstypen (*Schema 11*) *per exclusionem* schlussendlich nur der Modus der 'reverse'-*Hoogsteen*-Paarung in Frage kommt, gelangte man auf folgendem Wege.

Ausgangsinformation war die antiparallele Strang-Orientierung. Diese ergab sich für (A/A)-gepaarte Stränge hauptsächlich aus der in *Kap. 2.6* erörterten Relation zwischen der Basensequenz und dem Paarungsverhalten (A/G)-gemischter Homo-DNS-Oligonucleotide. Der für die (A/A)-Paarung an sich plausibelste und deshalb zuerst in Betracht gezogene Modus der 'reverse'-*Watson-Crick*-Paarung (*Schema 11*, rechts oben) hatte deshalb zu entfallen, weil nach dem ¹H-NMR-Spektrum die (Basen-Pyranose)-Verknüpfung sowohl in ddGlc(A₈) als auch in ddGlc((A-G)₃) *anti*-Konformation aufweist (vgl. *Kap. 3.2.3*). Dies ist bei 'reverse'-*Watson-Crick*-Paarung nur mit paralleler Strang-Orientierung vereinbar. Weil der Konstitutionstyp der *Hoogsteen*-Paarung (*Schema 11*, links unten) bei *anti-anti*-Konformation der Basen ebenfalls parallele Strang-Orientierung verlangt, entfällt dieser Paarungsmodus aus gleichen Gründen.

Ein normaler, mit antiparalleler Strang-Orientierung einhergehender Paarungsmodus des *Watson-Crick*-Typs zwischen zwei Adeninen wäre dann möglich, wenn einer der beiden Adenin-Kerne als Imin-Tautomer am Paarungsprozess teilnehmen würde (*Schema 11*, oben links). In einer der frühen Phasen der Untersuchung richtete sich unser Bemühen auf diese Möglichkeit, und zwar aus zwei Gründen. Zum einen weist dieser Paarungsmodus eine ähnliche Geometrie der Basen-Zucker-Verankerung auf wie die normale *Watson-Crick*-(Purin-Pyrimidin)-Paarung (Distanz zwischen Verankerungsstellen allerdings *ca.* 13 Å statt *ca.* 11 Å); dieser Aspekt schien uns seinerzeit deshalb von Gewicht zu sein, weil das Paarungsverhalten von Basensequenzen, die zum Zwecke der Bestimmung der Strang-Orientierung von (A-T)-Duplexen untersucht wurden, das Vorkommen von sowohl (A/A)- als auch (A/T)-Paarungen im gleichen Paarungskomplex wahrscheinlich machte (vgl. *Fussnoten 32* und *33*). Zum andern schien uns die Möglichkeit einer (Adenin/Adenin-Imin)-Paarung unvoreingenommene Aufmerksamkeit aus chemischer Sicht zu verdienen: zwar scheint die Literatur über Oligonucleotide der natürlichen Reihe kein authentifiziertes Beispiel zu kennen, in welchem Adenin als Imin-Tautomer in einem Basenpaar vorkommt [15] (S. 110), und spektroskopische Untersuchungen über die Lage des (Amin-Imin)-Gleichgewichts von Adeninen in wässriger Lösung hatten zum Schluss geführt, dass darin das Amino-Tautomer um einen Faktor zwischen 10² bis 10⁴ überwiegen dürfte [43] [15] (S. 114). Doch durch die Kombination eines (Adenin-imin)- mit einem (Adenin-amin)-Tautomer nach dem *Watson-Crick*-Modus entstünde insofern eine einzigartige und allen konventionellen Basenpaarungen fremde Situation, als hier ein zweizähniges H-Brückensystem mit *identischen* Grenzstrukturen des zweifachen synergistischen Protonenwechsels vorliegen würde (vgl. Formelbilder in *Fussnote 40*). Von einem solchen, kraft seiner besonderen konstitutionellen Symmetrie perfekt synergistischen System wäre (zumindest) in Erwägung zu ziehen, dass es sich durch einen symmetriebedingten Bonus an H-Verbrückungsenthalpie auszeichnen und dadurch einen zusätzlichen Teil der ihr entgegenwirkenden Tautomerisierungs-

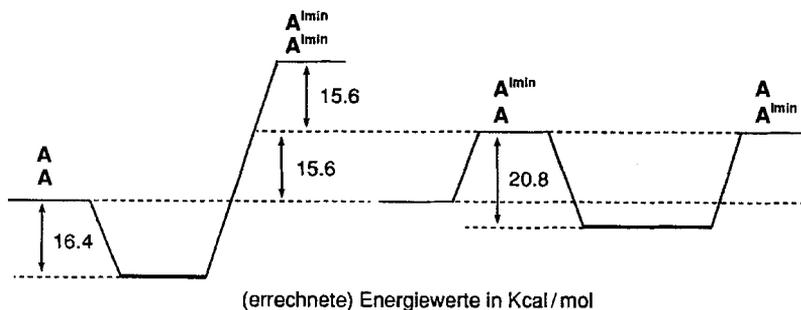
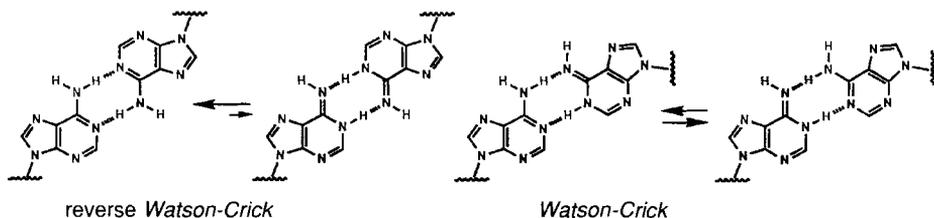
Schema 11. (*Adenin/Adenin*)-Paarung: Konstitution*)

- *) The assignment of the 'reverse'-*Hoogsteen* mode to adenine-adenine pairing in the homo-DNA series rests on the following arguments: $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy of the $\text{ddGlc}(A_6)$ duplex reveals the *anti*-conformation at the nucleosidic bonds (Fig. 29). Since strand orientation in homo-DNA duplexes based on purine-purine pairing is *antiparallel* (Scheme 4), the pairing cannot be either *reverse-Watson-Crick* or *Hoogsteen*. The chemically appealing possibility that homo-DNA (but not DNA) topology might sustain the special case of *Watson-Crick* adenine-adenine pairs, in which one of the adenine partners would participate as its (*per se*, unstable) imino tautomer, has been considered. A synergistic H-bond system between *identical* base partners, one participating as an unstable tautomer, would be uniquely symmetrical, with bonding energy expected to be higher than that of a normal base pair (see Fig. in Footnote 40). If it were the case that this – together with a specific topological preference provided by the homo-DNA backbone – would overcompensate the (opposing) tautomerization energy, then adenine-hypoxanthine pairing should occur in the homo-DNA series and be stronger than adenine-adenine pairing. The experimental results show the opposite (see comments to Scheme 12 and Fig. 24). Finally, in corroboration, the pairing properties of $\text{ddGlc}(A_6)$, when five of the adenines are replaced by 7-carbaadenines (see Fig. 25), demand that adenine-adenine pairing in homo-DNA engage the N(7) of at least one adenine partner.

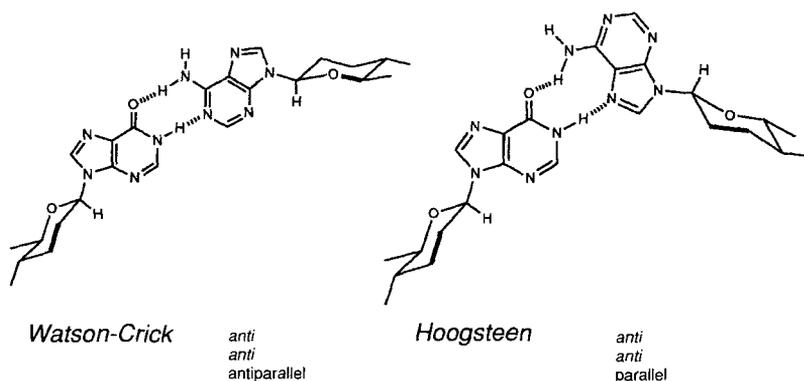
thalpie kompensieren würde⁴⁰⁾. Entscheidend für das Auftreten eines solch unkonventionellen Paarungsmodus hätte indessen eine topologisch spezifische Begünstigung der Basen-Zucker-Verankerung eines (Purin-Purin)-Basenpaares nach dem *Watson-Crick*-Typ durch das Homo-DNS-Rückgrat zu sein.

Das erste Argument, auf Grund dessen der *Watson-Crick*-Modus der (A/A)-Paarung der Homo-DNS-Reihe zu entfallen hatte, war chemischer Natur und beruhte auf dem eigens zur Klärung der Frage untersuchten Paarungsverhalten von Homo-DNS-Oligonucleotiden mit (Adenin/Hypoxanthin)-Paarung [8]. Falls die bei Homo-DNS-Oligonucleotiden beobachtete (A/A)-Paarung tatsächlich vom *Watson-Crick*-Typ wäre, d. h. eine (Amin-Imin)-Paarung implizierte, stünde zu erwarten, dass die (Adenin-Hypoxanthin)-Paarung in der Homo-DNS-Reihe ebenfalls topologisch spezifisch begünstigt zu sein hätte wie die (A/A)-Paarung, da sie als *Watson-Crick*-Paarung *isomorph* wäre mit der (Adenin/Adenin-imin)-Paarung (vgl. *Schema 12*). Da sie über die topologische Gleichstellung hinaus aber keine obligat endotherme Tautomerisierung eines der beiden Paarungspartner voraussetzte, wie dies die (Adenin-/Adenin-imin)-Paarung tun würde, müssten Homo-DNS-Oligonucleotide mit antiparallel selbstkomplementären (Adenin-Hypoxanthin)-Sequenzen stabilere Duplexe bilden als Homo-DNS-Oligonucleotide mit entsprechenden (A-A)-Sequenzen. Experimentell findet man genau das Gegenteil.

⁴⁰⁾ Prof. T. K. Ha (Institut für physikalische Chemie, ETH-Zürich) hat für uns orientierende *ab initio*-Berechnungen (*Hartree-Fock SCF*, Basisatz 3-21 G) der Energetik der beiden Varianten der Selbstpaarung des Adenins (*Watson-Crick* und 'reverse'-*Watson-Crick*) durchgeführt. In dem von ihm benützten Modell [44] betrüge die Stabilisierung des Ensembles je eines Amin- und Imin-Tautomeren durch H-Verbrückung nach dem *Watson-Crick*-Modus 20,8 kcal/mol, die Stabilisierung zweier normaler Adenine nach dem 'reverse'-*Watson-Crick*-Modus nur 16,4 kcal/mol. Da in diesem Modell der Übergang eines Adenins in sein Imin-Tautomer 15,6 kcal/mol benötigt [44] (vgl. auch [45]), wäre also eine konventionelle 'reverse'-*Watson-Crick*-Paarung um 11,2 kcal/mol günstiger als die *Watson-Crick*-Paarung *via* das Imin-Tautomer. Folgeberechnungen mit weitgehender Geometrie-Optimierung veränderten dieses Bild nur unwesentlich. Wir danken Prof. T. K. Ha für seine Hilfe und die freundliche Erlaubnis, seine Ergebnisse hier erwähnen zu dürfen.



Schema 12. (Adenin/Hypoxanthin)-Paarung: Konstitution*)



*) The two chemically feasible pairing modes for hypoxanthine-adenine pairing. The *Watson-Crick* mode would be isomorphous with the *Watson-Crick* adenine-adenine-imine pair of *Scheme 11*.

Das Homo-DNS-Oligonucleotid ddGlc(H₆) [8] zeigt unter Bedingungen, da ddGlc(A₆) den bei 47° schmelzenden Paarungskomplex (*Fig. 1a*) bildet, weder eine temperatur-abhängige Hyperchromizitätskurve, noch eine Temperatur-Abhängigkeit seines CD-Spektrums⁴¹). Ein Gemisch äquimolarer Mengen der beiden Oligonucleotide zeigt keinerlei Anzeichen einer Mischpaarung; in der Gel-Elektrophorese erscheint kein Mischpaarungsfleck, sondern die Flecken der beiden Komponenten wandern völlig unabhängig (und deutlich verschieden) voneinander [8]. Der Paarungskomplex von ddGlc(A₆) wird also durch den Einzelstrang ddGlc(H₆) nicht gebrochen, ähnlich wie dies auch bezüglich ddGlc(T₆) zutrifft (vgl. *Kap. 2.2*). Die Existenz einer spezifischen (Adenin-Hypoxanthin)-Paarung zeigte sich indessen in der Reihe der antiparallel selbstkomplementären Block-Polymeren ddGlc(A_n-H_n) beim Duplex von ddGlc(A₄-H₄): während die temperatur-abhängigen CD-Spektren der bei 34° bzw. 47° (*c* ≈ 11 μM) schmelzenden Paarungskomplexe von ddGlc(A₅-H₅) (*Fig. 24b*) und ddGlc(A₆-H₄) (*Fig. 24a*) klar dem CD-Spektrum des Duplexes von ddGlc(A₆) (*Fig. 1d*) entsprechen, ist das CD-Spektrum des (bei *c* = 12 μM unterhalb 15°) [8] schmelzenden Duplexes von ddGlc(A₄-H₄) (*Fig. 24c*) von eindeutig anderem Typ. Dies ist dahin zu interpretieren, dass die zwei erstgenannten Oligonucleotide Komplexe bilden, die auf (A/A)-Paarung unter Sequenzrahmen-Verschiebung beruhen, ddGlc(A₄-H₄) hingegen einen Komplex mit (Adenin-Hypoxanthin)-Paarung vorstellt (vgl. das Verhalten entsprechender Sequenzen, die Thymin anstelle von Hypoxanthin enthalten, *Kap. 2.2*). Grundsätzlich kann es sich in dieser (Adenin-Hypoxanthin)-Paarung um den *Watson-Crick*- oder den *Hoogsteen*-Typ handeln (vgl. *Schema 12*). Nach dem Ergebnis der weiter unten (*Kap. 3.2.3*) näher beschriebenen, ¹H-NMR-spektroskopischen Ermittlung der Konformation der nucleosidischen Basenverknüpfung (diese ist für beide Basen *anti*), muss es der *Watson-Crick*-Typ sein. Das (Adenin-Hypo-

⁴¹) Die Herstellung der hier erörterten Hypoxanthin-haltigen Homo-DNS-Oligonucleotide ist im Teil II dieser Reihe [2] nicht beschrieben, wird jedoch im Teil V [14] nachgetragen werden. Die hier erwähnten, mit Ausnahme der *Fig. 24* hier nicht dokumentierten Paarungseigenschaften von Hypoxanthin-haltigen Homo-DNS-Oligonucleotiden sind in [8] beschrieben.

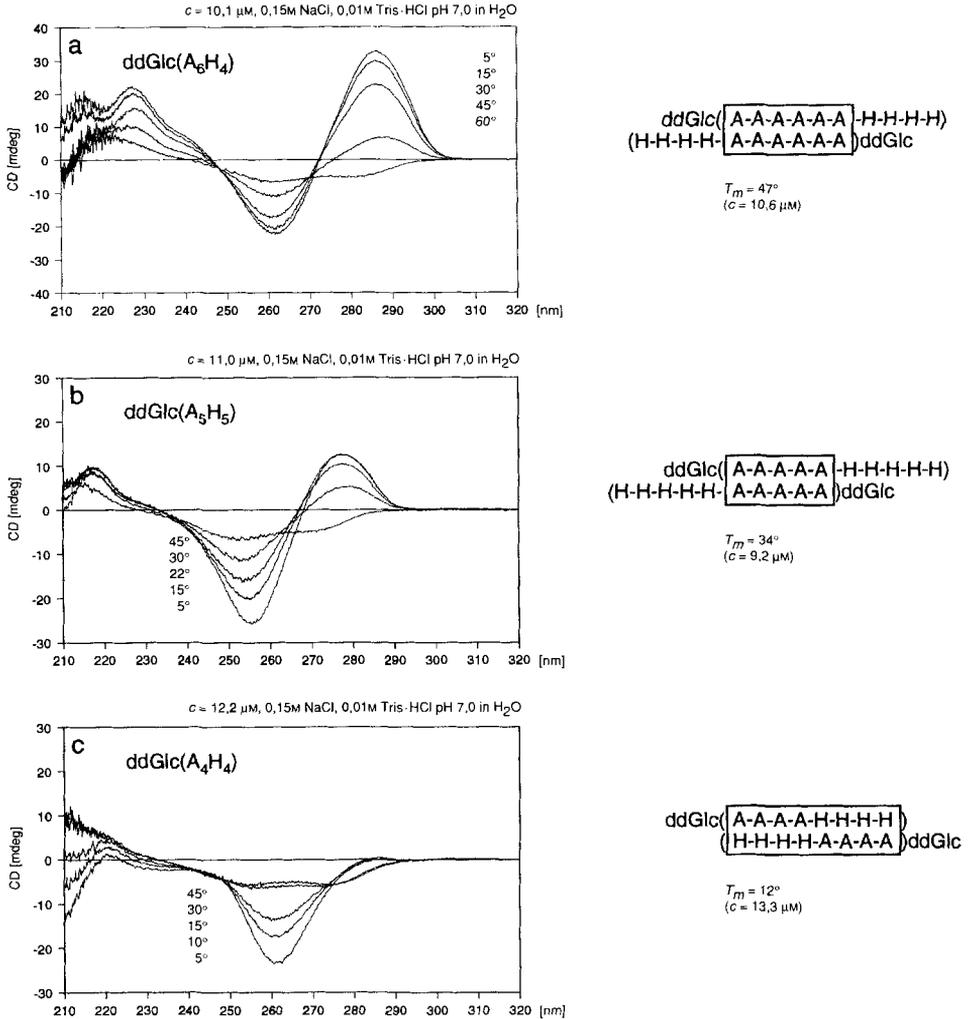


Fig. 24. (Adenin/Hypoxanthin)-Paarung: Nachweis durch DC-Spektroskopie *)

- *) ddGlc(H_6) does not show a UV-melting curve or temperature dependence of its CD-spectrum [8], nor does ddGlc(H_6) break the duplex of ddGlc(A_6) when the two oligonucleotides are present in a 1:1 mixture (UV, gel electrophoresis) [8]. If adenine-adenine pairing were of *Watson-Crick* type, one would expect the isomorphous hypoxanthine-adenine pairing to be stronger, since promotion of a stable to an unstable tautomer is not required in the latter case. *Watson-Crick* hypoxanthine-adenine pairing is believed to operate in the case of (antiparallel) self-complementary ddGlc($\text{A}_4\text{-H}_4$), according to CD (Fig. 24c as compared to Fig. 24a, b) as well as NMR spectroscopy (Fig. 30) (*anti*-conformation of adenines as well as hypoxanthines). For the preparation of hypoxanthine-containing ddGlc-oligonucleotides, see [8].

xanthin)-Basenpaar in ddGlc(A₄-H₄) weist also in räumlicher Hinsicht jene Rückgrat-Verankerung auf, welche auch die *Watson-Crick*sche (Adenin/Adeninimin)-Paarung in ddGlc(A_n)-Duplexen aufzuweisen hätte, falls deren (A/A)-Paarung dem *Watson-Crick*-Typ angehörte. Die experimentell offen gelegte Schwäche der (Adenin-Hypoxanthin)-Paarung nach dem *Watson-Crick*-Modus (sie ist schwächer als die (A/T)-Paarung) schliesst die Vorstellung aus, wonach eine (Adenin/Adeninimin)-Paarung in der Homo-DNS-Reihe durch eine topologisch besonders vorteilhafte Basenpaar-Verankerung ermöglicht sein könnte⁴²).

Von den vier in *Schema 11* formulierten Paarungsvarianten, die für die (A/A)-Paarung in ddGlc(A_n)-Oligonucleotiden aus chemischer Sicht in Betracht zu ziehen waren, kam schlussendlich nach dem bisher Gesagten nur noch der 'reverse'-*Hoogsteen*-Modus (*Schema 11*, unten rechts) in Frage. Als wir aus den an sowohl ddGlc(A₅-T₅) als auch an ddGlc(A₆) angelaufenen Versuchen zur NMR-spektroskopischen Struktur-Ermittlung zur Kenntnis nehmen mussten, dass in der Homo-DNS-Reihe die NMR-spektroskopische Direktbeobachtung des Basenpaarungsmodus infolge der hohen Austauschgeschwindigkeit der *N*-gebundenen Protonen auf Schwierigkeiten stösst, haben wir die im präparativen Ersatz von Adenin durch 7-Carbaadenin liegenden Möglichkeiten der chemischen Konstitutionskontrolle auf das Problem der (A/A)-Paarung angewandt. Das zu diesem Zwecke hergestellte (vgl. [2]) und zum Aufbau entsprechend markierter ddGlc-Oligonucleotide verwendete 7-Carbaadenin haben wir dann im Zuge der Untersuchungen auch zur Klärung anderer Paarungs-Konstitutionsprobleme eingesetzt; die Ergebnisse von zwei solchen Einsätzen sind bereits erörtert worden (vgl. *Fig. 22*, *Kap. 3.1.1* und *3.1.3*).

In allen 7-Carba-markierten Oligonucleotiden, die an ihrem 4'-Ende eine ddGlc-Adenosin-Einheit aufweisen, ist das endständige Adenin (als einziges aller in der Sequenz vorkommenden Adenine), unmarkiert; dies hat präparative Gründe: beim Aufbau 7-Carba-markierter Oligonucleotide wurde jeweils ein mit unmarkiertem ddGlc-Adenosin belegtes Syntheseträgermaterial verwendet.

Das fünffach markierte Homo-DNS-Oligonucleotid ddGlc(¹³C-A₅-A) zeigt weder UV- noch CD-spektroskopische Anzeichen einer Selbstpaarung (*Fig. 25*). Dies steht in Übereinstimmung mit der Erwartung und stützt den Vorschlag, dass die Selbstpaarung von (unmarkiertem) ddGlc(A₆) nach dem 'reverse'-*Hoogsteen*-Modus erfolgt. Die Relevanz der Beobachtung findet eine willkommene Stütze darin, dass derselbe markierte (Einzel)Strang mit dem Einzelstrang ddGlc(T₆) eine normale (*Watson-Crick*sche) Mischpaarung eingeht, wie im *Kap. 3.1.1* dargelegt und in *Fig. 22* illustriert wurde. Der Verlust der Selbstpaarungsfähigkeit des ddGlc(A₆)-Strangs durch die obige (N→CH)-Markierung des Adenin-Kerns in Stellung 7 stützte im übrigen nicht nur die getroffene Zuordnung des Konstitutionstyps der (A/A)-Paarung, sondern schliesst auf zusätzliche Art auch noch die beiden eingangs erörterten *Watson-Crick*-Varianten dieser Paarung aus.

Der *Hoogsteen*- bzw. 'reverse'-*Hoogsteen*-Modus der (A/A)-Paarung ist ein in Kristall-Gittern von monomeren Adenosin-Derivaten röntgenanalytisch schon mehrfach

⁴²) Dass andererseits diese Art der Basenverankerung in der Homo-DNS-Reihe keine spezifischen Nachteile mit sich bringt, werden die Eigenschaften der im Teil V dieser Reihe [14] zu beschreibenden Hetero-(Purin-Purin)-Paarungen zwischen (Guanin-Isoguanin)- sowie (2,6-Diaminopurin-Xanthin)-Sequenzen zeigen (vgl. vorläufig [3]).

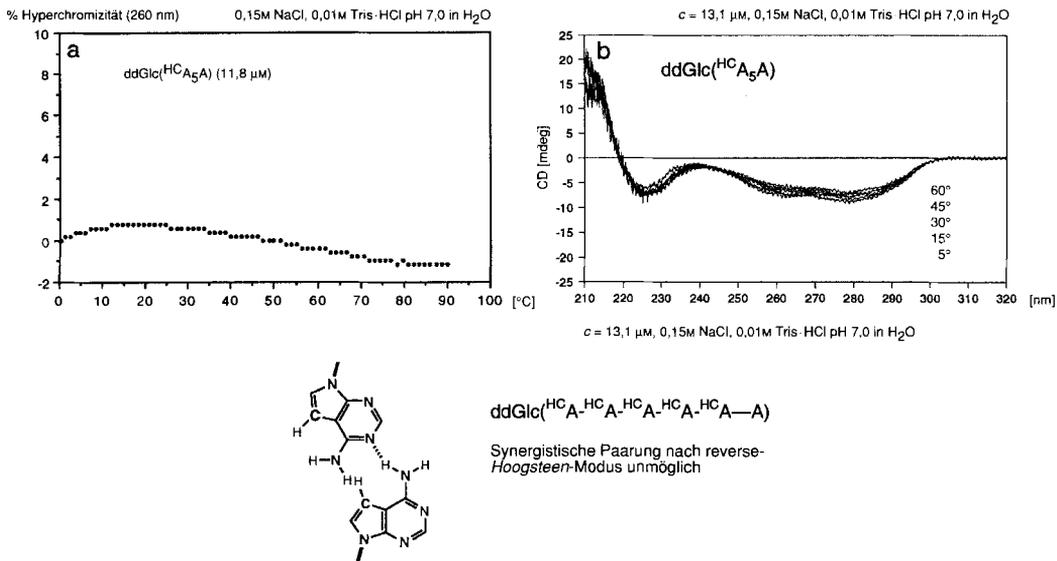


Fig. 25. (Adenin/Adenin)-Paarung: Markierungsexperiment mit 7-Carbaadenin*)

*) The replacement of five adenine moieties in $ddGlc(A_5)$ by 7-carbaadenine gives an oligonucleotide that no longer pairs with itself. Its capacity for *Watson-Crick* pairing remains intact, as the pairing with $ddGlc(T_6)$ (Fig. 22) demonstrates.

angetroffener Kontakt-Typ von Adenin-Kernen (vgl. Fussnote 14 in [2]). Das neueste Beispiel ist wohl das Kristall-Gitter des Homo-deoxyadenosins $ddGlc(A_5)$, selbst, dessen Röntgenstruktur im Teil II dieser Reihe beschrieben (vgl. Fig. 2 in [2]) und dessen (Adenin-Adenin)-Paarungsmuster hier zur Orientierung über die Struktur-Daten dieses Paarungstyps in Fig. 26 wiedergegeben ist.

3.2.2. Die (Guanin/Guanin)-Paarung erfolgt ebenfalls nach dem 'reverse'-Hoogsteen-Modus. Die Konstitutionszuordnung für die (G/G)-Paarung geht vom Paarungsverhalten aus, welches an den in den Schema 4 und 5 behandelten Homo-DNS-Oligonucleotiden mit den gezielt gewählten (Adenin-Guanin)-Sequenzen beobachtet wurde und welches einerseits die antiparallele Strang-Orientierung und andererseits die anscheinend zwangslose strukturelle Kompatibilität von (G-G)- mit (A-A)-Basenpaaren in alternierender Anordnung innerhalb solcher Paarungskomplexe nachweist. Am Duplex des Oligonucleotids $ddGlc((A-G)_3)$ ist 1H -NMR-spektroskopisch festgestellt, dass in ihm sowohl die Adenin- als auch die Guanin-Basen *anti*-Konformation einnehmen (vgl. Kap. 3.2.3). Der Versuch, diesen Nachweis auch für den um 40° (vgl. Fig. 11) schmelzenden Selbstpaarungskomplex von $ddGlc(G_6)$ zu führen, scheiterte an dessen Eigenschaft, unter den Konzentrations-, Temperatur- und Zeit-Bedingungen einer zweidimensionalen 1H -NMR-Analyse irreversibel aus der Mess-Lösung auszufallen (weiteres darüber vgl. unten). Zur Zeit beruht deshalb die unserer Konstitutionszuordnung für die (G/G)-Paarung zu Grunde gelegte *anti*-Konformation der Base einzig auf der an $ddGlc((A-G)_3)$ gemachten Beobachtung.

anti-Konformationstyp der nucleosidischen Basen-Verknüpfung und antiparallele Strang-Orientierung sind als Entscheidungskriterien hinreichend, um von den insgesamt

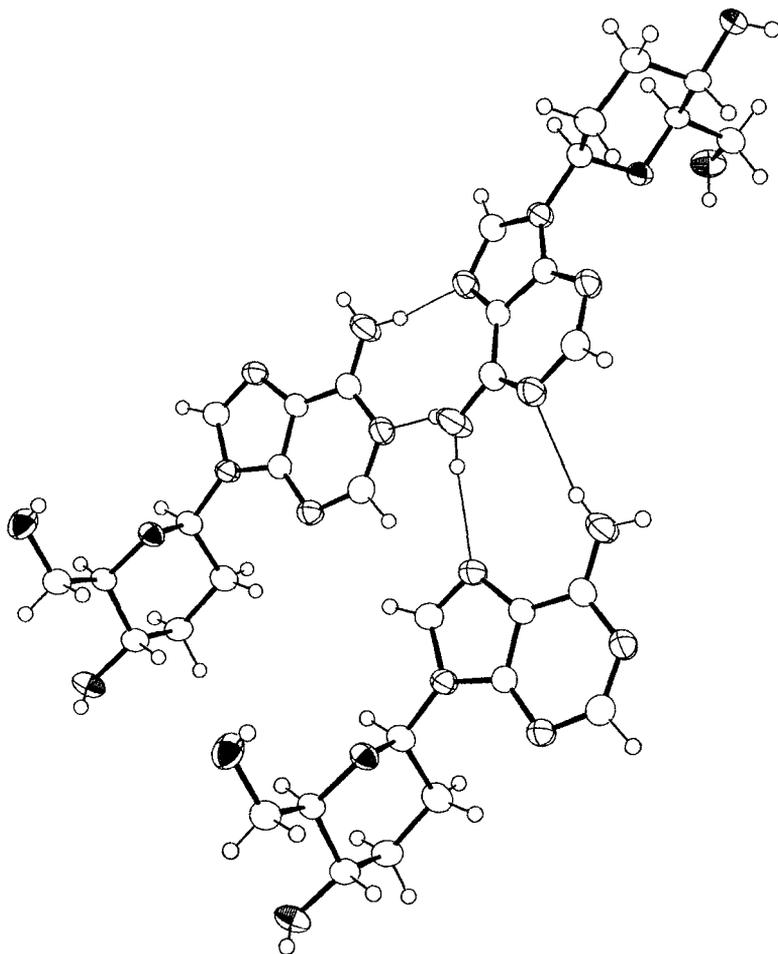


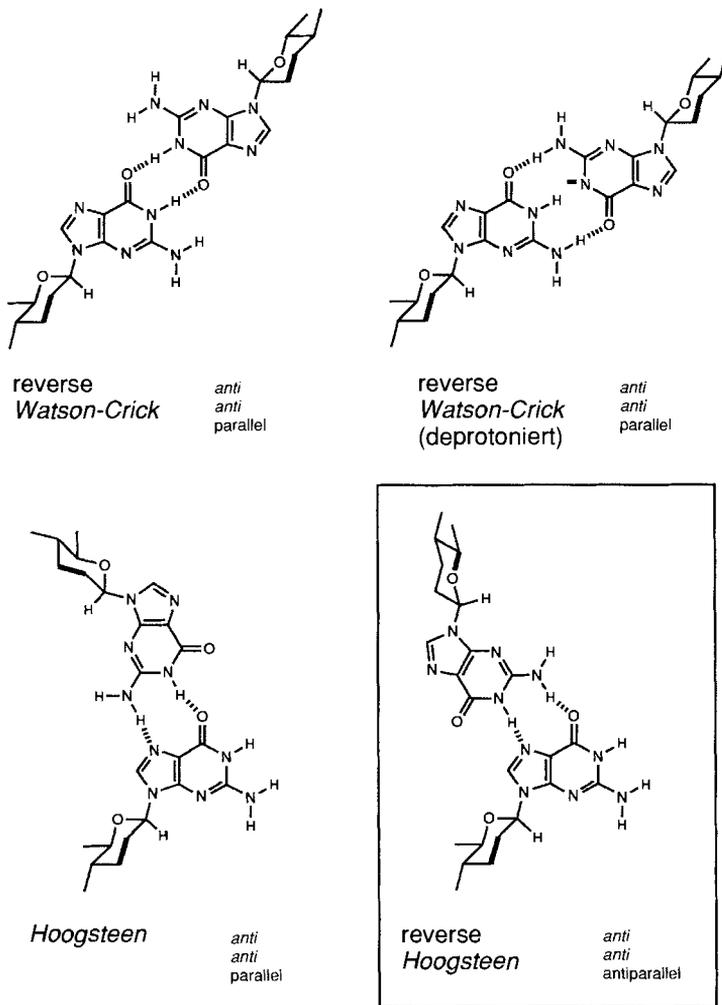
Fig. 26. (Adenin/Adenin)-Paarung beim kristallinen Homo-2'-deoxyadenosin*)

*) The X-ray crystal structure of the nucleoside homo-2'-deoxyadenosine (see part II of this series [2]) shows the adenine nuclei H-bonded in reverse-*Hoogsteen* fashion.

vier aus chemischen Gründen in die Betrachtung einzubeziehenden Konstitutionstypen einer (G/G)-Paarung den Modus der 'reverse'-*Hoogsteen*-Paarung als den einzig in Frage kommenden zu postulieren**) (*Schema 13*). Er entspricht auch der oben erwähnten Forderung, mit der (A/A)-Paarung strukturell kompatibel sein zu müssen. Der Konstitutionstyp der 'reverse'-*Hoogsteen*-Paarung ist für die Selbstpaarungen des Adenins und des Guanins zwar nicht isomorph, aber doch *quasi*-isomorph, wie *Schema 14* andeutet.

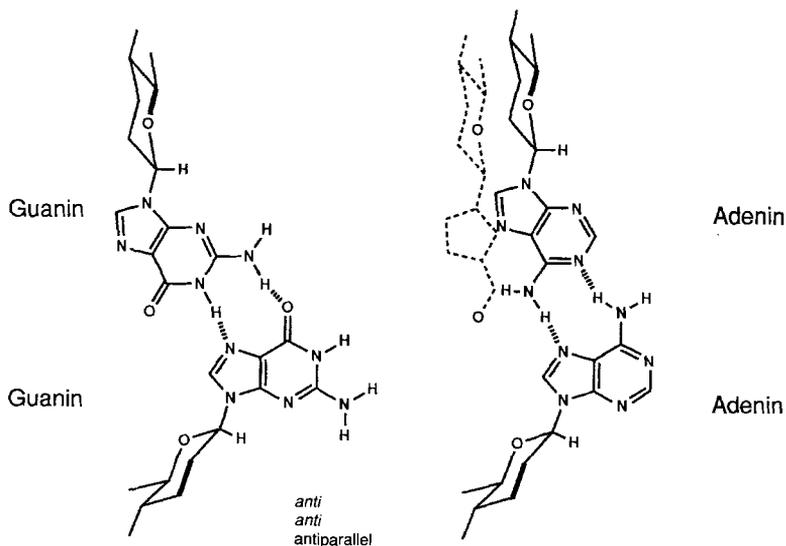
Der vorgenommene Ausschluss der beiden 'reverse'-*Watson-Crick*-Varianten (*Schema 13*, oben) ist durch Beobachtungen chemischer Art zusätzlich gestützt. So hat die an sich interessante Möglichkeit, dass ein (G/G)-Paar in 'reverse'-*Watson-Crick*-An-

**) *Note added in proof*. In the meantime, we have confirmed that ddGlc(⁷CH₅-G) does not pair with itself, but pairs normally with ddGlc(C₆) (experiments by A. Holzner).

Schema 13. (*Guanin/Guanin*)-Paarung: Konstitution*)

- *) That guanine-guanine pairing in ddGlc(A,G)-oligonucleotides (Scheme 4) prefers antiparallel strand orientation, and that the conformation of the guanine bases in the duplex of ddGlc((A-G)₃) is *anti* (see Fig. 28a, b), both point to reverse-*Hoogsteen* as the mode for guanine-guanine pairing in homo-DNA duplexes. The formally appealing possibility of a mono deprotonated guanine-guaninate pairing is additionally excluded by the observation that the T_m value of self-paired ddGlc(G₆) is independent of pH in the region pH 4–9 (Fig. 23). Note that the pairing mode postulated for guanine-guanine self-pairing in the homo-DNA series is different from the one present in the guanine tetrad in the natural series.

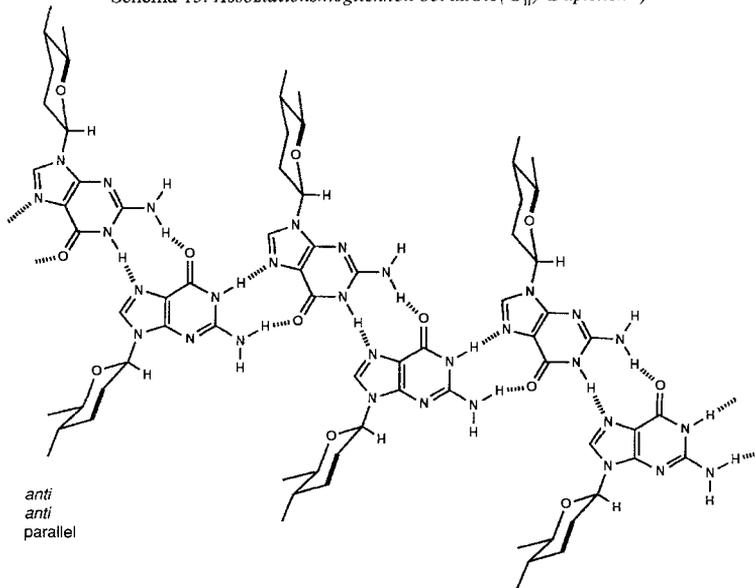
Schema 14. Quasi-Isomorphie der (Adenin/Adenin)- und (Guanin/Guanin)-Paarung*)



*) Experiment strongly indicates that adenine-adenine and guanine-guanine pairing in homo-DNA must be spatially compatible with each other within a duplex (Scheme 4 and 5). In fact, the 'reverse'-Hoogsteen modes of the two pairings are not completely, but quasi-isomorphous.

ordnung mit aussergewöhnlicher Leichtigkeit ein Proton verlieren könnte, weil dadurch eine perfekt synergistisch-dreizählige H-Verbrückung zustande käme (Schema 13, oben rechts) in einer Frühphase der Untersuchungen eine Überprüfung der pH-Abhängigkeit der Selbstpaarung von ddGlc(G₆) veranlasst. Dabei wurde gefunden, dass die Schmelz-Temperatur des Paarungskomplexes im pH-Bereich 4–9 von der Azidität der Lösung unabhängig ist (Fig. 23). Was die zweizählige (neutrale) Version der 'reverse'-Watson-Crick-Paarung anbetrifft (Schema 13, oben links), so würde diese die ungefähr gleiche Energetik aufzuweisen haben wie die entsprechende (isomorphe) (Hypoxanthin/Hypoxanthin)-Paarung. Von letzterer ist nachgewiesen, dass sie bei ddGlc(H₆) oberhalb 0° nicht auftritt (vgl. Kap. 3.2.1 und [8]).

Der hier auf Grund von Strang-Orientierung und Basenkonformation ausgeschlossene Hoogsteen-Paarungsmodus (Schema 13, unten links) ist jener, der die Möglichkeit der Ergänzung zu einer Guanin-Tetrade in sich trägt, wie dies in der natürlichen Reihe beobachtet wird (vgl. Schema 10). Die Konstitution dieser Tetrade erlaubt die cyclisch geschlossene Absättigung der im (G/G)-Paar des Hoogsteen-Typs noch verbleibenden freien Paarungsaffinitäten. Eine Absättigung der entsprechenden Affinitäten des 'reverse'-Hoogsteen-Paars käme einem Oligomerisierungsprozess in der zu den Rückgrat-Strängen des (G/G)-Duplexes orthogonalen Richtung gleich (Schema 15), was (im Falle einer idealisiert linearen Duplex-Struktur) zu einer Schicht-Vernetzung durch 'reverse'-Hoogsteen-Verbrückung mit durchgehender Antiparallelität benachbarter Stränge führen würde. Der Gedanke liegt nahe, diese Oligomerisationsmöglichkeit eines 'reverse'-Hoogsteen-(G/G)-Duplexes mit der oben erwähnten Beobachtung in Zusammenhang zu

Schema 15. Assoziationsmöglichkeit bei $ddGlc(G_n)$ -Duplexen*)

- *) Self-paired $ddGlc(G_6)$ could not be analyzed by NMR spectroscopy, because of precipitation from solutions when concentrated. In contrast to the (*Hoogsteen*) guanine-guanine pairing operating in the guanine tetrade (see *Scheme 11*), 'reverse'-*Hoogsteen* guanine-guanine pairing in a $ddGlc(G_6)$ duplex does not saturate all pairing valences of the base partners, leaving open the opportunity for the hypothetical inter-duplex aggregation shown above.

bringen, dass der Paarungskomplex von $ddGlc(G_6)$ unter den (relativ hochkonzentrierten und längere Zeit beanspruchenden) Bedingungen einer zweidimensionalen 1H -NMR-Analyse irreversibel aus der Lösung ausfiel.

3.2.3. 1H -NMR-spektroskopische Bestimmung des Konformationstyps der (Zucker-Basen)-Verknüpfung in den Paarungskomplexen von $ddGlc(A_6)$, $ddGlc((A-G)_3)$ und $ddGlc(A_4-H_4)$ ⁴³). Der Konformationstyp der nucleosidischen Verknüpfung (*anti*- bzw. *syn*, vgl. *Scheme 6*) lässt sich in der Homo-DNS-Reihe analog wie bei Oligonucleotiden der natürlichen Reihe [32] [46] aus den relativen Intensitäten der intranucleotidischen Kern-Overhauser-Effekte (NOE) zwischen den Protonen H-C(8) der Purin-Base und den Protonen H-C(2') und H-C(1') des Zucker-Teils bestimmen. Bei eindeutiger *anti*-Stellung (typischerweise $-170^\circ < \chi < -90^\circ$) sind ausgehend vom Purin-Proton H-C(8) abnehmende NOE Intensitäten in der Reihenfolge $H_\beta-C(2') > H_\alpha-C(2')$

⁴³) Im Hinblick auf Teil IV dieser Reihe [12] beschränkt sich hier die Behandlung der NMR-analytischen Untersuchungen an den drei Oligonucleotiden $ddGlc(A_6)$, $ddGlc((A-G)_3)$ und $ddGlc(A_4-H_4)$ auf die im vorliegenden Zusammenhang unmittelbar interessierenden Ergebnisse. Ins Detail gehende Darstellungen der NMR-Analysen finden sich in den gedruckt vorliegenden Dissertationen von *Böhlinger* [5] (für $ddGlc(A_6)$, vgl. S. 109–149), *Hunziker* [6] (für $ddGlc((A-G)_3)$, vgl. S. 132–159) und *Diederichsen* [8] ($ddGlc(A_4-H_4)$, vgl. S. 66–85). Die Spektroskopie von $ddGlc(A_6)$ wurde grossenteils im Laboratorium von Dr. H. Widmer (*Sandoz AG*, Basel) durchgeführt, wofür wir Herrn Dr. Widmer zu Dank verpflichtet sind.

$\gg \text{H}-\text{C}(1')$ zu erwarten, bei eindeutiger *syn*-Stellung ($40^\circ < \chi < 90^\circ$) – umgekehrt $\text{H}-\text{C}(1') \gg \text{H}_\alpha-\text{C}(2') > \text{H}_\beta-\text{C}(2')$.

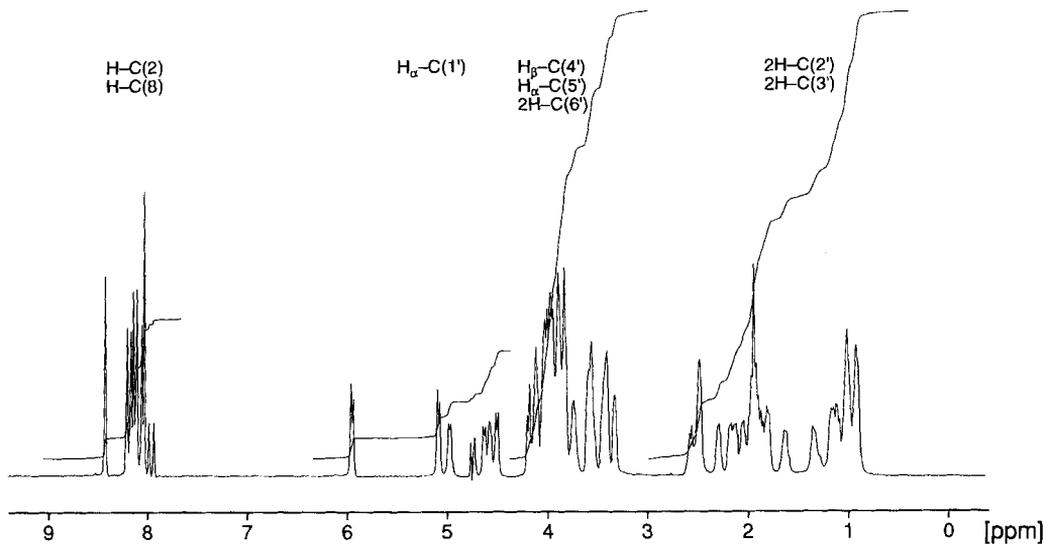
Die Spektren von $\text{ddGlc}(\text{A}_6)$ [5] und $\text{ddGlc}(\text{A}-\text{G})_3$ [6] zeigen je sechs verschiedene chemische Verschiebungen für die Protonen $\text{H}-\text{C}(1')$ und fünf unterscheidbare ^{31}P -Verschiebungen, $\text{ddGlc}(\text{A}_4-\text{H}_4)$ [8] entsprechend acht $\text{H}-\text{C}(1')$ und sieben ^{31}P -Verschiebungen (Fig. 27 und Tab. 3–5). Dies entspricht der aus den bisher erörterten Untersuchungen abgeleiteten Vorstellung, dass die drei Oligonucleotide bei den in den NMR-Proben vorliegenden Konzentrationen weitgehend einheitlich als antiparallel-gepaarte Duplexe vorliegen, welche, zumindest im Zeitmittel über die NMR-Zeitskala, über C_2 -Symmetrie verfügen (s. untenstehende Diskussion des Paarungsfunktionstauschs). Voraussetzung für die Abschätzung der relevanten ‘crosspeak’-Intensitäten in den NOESY Spektren von $\text{ddGlc}(\text{A}_6)$, $\text{ddGlc}(\text{A}-\text{G})_3$ und $\text{ddGlc}(\text{A}_4-\text{H}_4)$ ist eine gesicherte Zuordnung der Signale von $\text{H}-\text{C}(1')$, $\text{H}_\alpha-\text{C}(2')$ und $\text{H}_\beta-\text{C}(2')$ jeder Zucker-Einheit. Diese gelang mit Hilfe von DQF-COSY- und (für $\text{ddGlc}(\text{A}-\text{G})_3$) sowie $\text{ddGlc}(\text{A}_4-\text{H}_4)$ TOCSY-Spektren; sie findet sich in den Tab. 3–5, in denen sämtliche getroffenen Signal-Zuordnungen für die drei Komplexe zusammengestellt sind. Mit Ausnahme der praktisch isochronen ($\text{H}-\text{C}(2')$)-Systeme der ersten beiden Hypoxanthin-Einheiten in $\text{ddGlc}(\text{A}_4-\text{H}_4)$ sind die Zuordnungen für $\text{H}-\text{C}(1')$, $\text{H}_\alpha-\text{C}(2')$ und $\text{H}_\beta-\text{C}(2')$ eindeutig. Im stark überlappenden Bereich von $\text{H}-\text{C}(5')$ und $\text{H}-\text{C}(6')$ dagegen, sind einzelne Zuordnungen (insbesondere für $\text{ddGlc}(\text{A}_4-\text{H}_4)$) entweder mehrdeutig oder müssen ganz offen bleiben. Für alle drei Paarungskomplexe gelang auch die sequentielle Zuordnung der einzelnen Zucker-Einheiten über die skalare (^1H , ^{31}P)-Verschiebungskorrelation und, im Fall von $\text{ddGlc}(\text{A}-\text{G})_3$ und $\text{ddGlc}(\text{A}_4-\text{H}_4)$, mit Hilfe ergänzender Information aus sequentiellen NOESY ‘crosspeaks’. Die Korrelation der einzelnen Purin-($\text{H}-\text{C}(8)$)-Protonen mit dem zur gleichen Nucleotid-Einheit gehörigen Zucker-Spinsystem ergibt sich aus den NOESY ‘crosspeaks’ zu den ($\text{H}_\beta-\text{C}(2)$)-Protonen; diese (intranucleotidischen) ‘crosspeaks’ sind deutlich stärker als alle anderen NOE zu $\text{H}-\text{C}(8)$.

In den NOESY-Spektren (Misch-Zeit > 100 ms) der drei Komplexe zeigen die Purin-($\text{H}-\text{C}(8)$)-Protonen durchwegs einen starken ‘crosspeak’ mit $\text{H}_\beta-\text{C}(2')$, einen schwächeren mit $\text{H}_\alpha-\text{C}(2')$ und einen deutlich schwächeren mit $\text{H}-\text{C}(1')$. Um den Einfluss der Spin-Diffusion ([32], S. 328) zu überprüfen, wurden für $\text{ddGlc}(\text{A}-\text{G})_3$ und $\text{ddGlc}(\text{A}_4-\text{H}_4)$ auch NOESY-Spektren mit kürzeren Mischzeiten (50–60 ms) aufgenommen (Fig. 28–30; umständehalber stehen für $\text{ddGlc}(\text{A}_6)$ keine NOESY Spektren mit weniger als 100 ms Misch-Zeit zur Verfügung). In ihnen sind die ‘crosspeaks’ von $\text{H}-\text{C}(8)$ zu $\text{H}-\text{C}(1')$ und (weniger ausgeprägt) auch zu $\text{H}_\alpha-\text{C}(2')$, bezogen auf $\text{H}-\text{C}(8)/\text{H}_\beta-\text{C}(2')$, deutlich schwächer als in den Spektren mit längeren Misch-Zeiten; dies weist klar darauf hin, dass sie hauptsächlich der Spin-Diffusion von $\text{H}_\beta-\text{C}(2')$ über das nahegelegene geminale $\text{H}_\alpha-\text{C}(2')$ zum $\text{H}-\text{C}(1')$ zuzuschreiben sind. *Das beobachtete, einheitliche Intensitätsmuster ist nur mit der Annahme einer anti-Stellung (Winkelbereich $\chi = -120 \pm 60^\circ$) sämtlicher Basen in allen drei untersuchten Paarungskomplexen zu vereinbaren.*

Ein Versuch zur quantitativen Auswertung der NOE-Daten mit dem Zweck, den Torsionswinkel χ näher einzugrenzen, wurde nicht unternommen. Die vorhandenen Daten erfüllen auch bezüglich der Quantifizierbarkeit der NOE und Kopplungskonstanten die Voraussetzungen nicht, um eine weitergehende Bestimmung der Rückgrat-Konformation durchzuführen. Die Wert-Bereiche von Kopplungskonstanten, wie sie sich

a)

ddGlc(A-A-A-A-A)
(A-A-A-A-A)ddGlc



b)

ddGlc(A-G-A-G-A-G)
(G-A-G-A-G-A)ddGlc

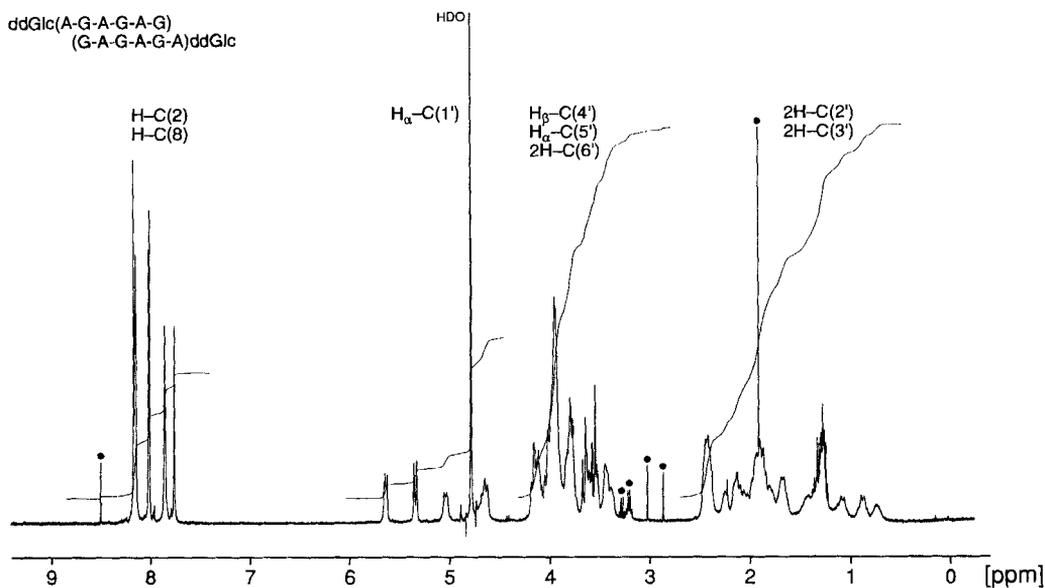


Fig. 27. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Duplexes von a) ddGlc(A_6) und b) von ddGlc($(A-G)_3$)^{*)}

^{*)} a) $^1\text{H-NMR}$ spectrum (500 MHz) of ddGlc(A_6): 4 mm ddGlc(A_6), 0.1M NaCl, 0.05M Na_2HPO_4 , H_3PO_4 , pH 7.0, 0.1% (w/v) NaN_3 in D_2O , 29° [5]. b) $^1\text{H-NMR}$ spectrum (400 MHz) of ddGlc(A-G-A-G-A-G): 9 mm ddGlc($(A-G)_3$), 0.1M Na_2HPO_4 , H_3PO_4 , pH 7.0 in D_2O , 27° [6].

Tab. 3. Chemische Verschiebungen der nicht austauschenden Protonen und der P-Atome im Duplex von ddGlc(A₆). Bedingungen vgl. Fig. 27a; Details vgl. [5].

ddGlc(A ₆)						
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆
H–C(1')	5,07	4,62	4,49	4,56	4,96	5,93
H _α –C(2')	1,01	0,91	0,92	1,03	1,18	2,48
H _β –C(2')	1,64	1,86	1,91	1,95	1,98	2,57
H _α –C(3')	0,95	1,02	1,11	1,14	1,36	1,94
H _β –C(3')	1,80	2,05	2,13	2,18	2,30	2,49
H–C(4')	3,73	3,88	3,96	4,03	4,12	4,01
H–C(5')	3,32	3,39	3,41	3,44	3,59	3,82
H–C(6')(S)	3,55	3,81	3,84	3,87	3,94	4,09
H–C(6')(R)	3,55	3,90	3,95	3,98	4,04	4,18
H–C(2)			7,90, 7,94, 8,00, 8,02, 8,02, 8,09			
H–C(8)	8,00	8,07	8,11	8,13	8,17	8,39
Nucleotid						
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆
Phosphat-Gruppe		P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅
δ(³¹ P) [ppm]		–0,08	–0,78	–0,84	–0,78	–0,55

 Tab. 4. Chemische Verschiebungen der nicht austauschenden Protonen und der P-Atome im Duplex von ddGlc((A-G)₃). Bedingungen vgl. Fig. 27b; Details vgl. [6].

ddGlc((AG) ₃)						
	A ₁	G ₂	A ₃	G ₄	A ₅	G ₆
H–C(1')	5,31	4,62	4,77	4,66	5,01	5,61
H _α –C(2')	1,28	0,73	1,38	1,08	1,78	2,40
H _β –C(2')	1,88	1,66	2,03	1,90	2,11	2,41
H _α –C(3')	1,32	0,88	1,44	1,08	1,68	1,85
H _β –C(3')	1,96	1,92	2,24	2,15	2,44	2,43
H–C(4')	3,78	3,75	3,96	3,95	4,11	3,96
H–C(5')	3,52	3,42	3,44	3,37	3,61	3,76
H–C(6')(S)	3,64	3,92	3,93	3,98	4,02	4,15
H–C(6')(R)	3,55	3,82	3,86	3,92	3,94	4,07
H–C(2)			7,97, 8,11, 8,13			
H–C(8)	7,98	7,72	8,10	7,81	8,11	7,82
Nucleotid						
	A ₁	G ₂	A ₃	G ₄	A ₅	G ₆
Phosphat-Gruppe		P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅
δ(³¹ P) [ppm]		–2,53	–2,93	–3,11	–2,85	–2,87

durch Ausweitung der DQF-COSY- und H,P-COSY-Spektren von ddGlc(A₆) und ddGlc((A-G)₃) ergeben, entsprechen [47] Wert-Bereichen für die Rückgrat-Torsionswinkel β, γ und ε (s. [5] [6]), welche dem für ddGlc-Duplexe erwarteten Konformationstyp *-sc,ap,sc,sc,ap,-sc* (vgl. [1] und *Schema 16*) zumindest nicht von vornherein widersprechen. Auf die Problematik der NMR-spektroskopischen Herleitung der Rückgrat-Konformation eines Homo-DNS-Duplexes wird im Detail im Teil IV eingegangen werden.

Tab. 5. Chemische Verschiebungen der nicht austauschenden Protonen und der P-Atome im Duplex von ddGlc(A₄H₄). Bedingungen vgl. Fig. 30; Details vgl. [8].

ddGlc(A ₄ H ₄)								
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	H ₅	H ₆	H ₇	H ₈
H–C(1')	5,14	4,80	4,89	5,44	5,45	5,46	5,64	5,80
H _α –C(2')	1,50	1,80	1,80	2,12	2,00	2,02	2,11	2,38
H _β –C(2')	1,03	0,92	0,90	1,68	1,61	1,61	1,91	2,21
H _α –C(3')	1,16	1,15	1,26	1,55	1,60	1,59	1,75	1,78
H _β –C(3')	1,91	2,06	2,13	2,32	2,30	2,32	2,44	2,34
H–C(4')	3,72	3,87	3,94	4,10	3,99	4,02	4,10	3,86
H–C(5')	3,39	3,48	3,55	3,70	3,76	3,76	3,83	3,80
H–C(6')(S)	3,61	3,86	3,92	3,98			4,02	4,15
H–C(6')(R)	3,54		3,76	3,88			3,93	3,93
H–C(2)			7,90, 7,94, 8,00, 8,02, 8,14, 8,15, 8,20, 8,25					
H–C(8)	7,97	8,08	8,13	8,21	8,16	8,26	8,30	8,33
Nucleotid	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	H ₅	H ₆	H ₇	H ₈
Phosphat-Gruppe	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	
δ(³¹ P) [ppm]	-0,05	-0,72	-0,65	-0,48	-0,45	-0,47	-0,08	

Der in Kap. 3.2.1 und 3.2.2 für die (A/A)- sowie (G/G)-Paarung abgeleitete, 'reverse'-Hoogsteen-Modus der Paarungskonstitution lässt für ddGlc((A-G)₃) keinen statischen Komplex mit der NMR-spektroskopisch beobachteten C₂-Symmetrie zu. Es muss also ein bezüglich der NMR-Zeitskala (Unterschied der chemischen Verschiebungen für Komplexe mit C₁-Symmetrie) innerhalb der einzelnen (A-A)- und (G-G)-Basenpaare ein rascher Austausch der Paarungsfunktionen stattfinden (vgl. Schema 17 und 18 im Kap. 4). Für ddGlc(A₆) ist zwar eine C₂-symmetrische Anordnung der beiden 'reverse'-Hoogsteen-Paarungsfunktionen entlang der Kette möglich, doch ist auch hier wahrscheinlich, dass ein rascher Paarungsfunktionswechsel stattfindet. Die Schlussfolgerung indessen, dass alle Basen in allen drei Komplexen eine anti-Konformation einnehmen, behält unabhängig von einem dynamischen Paarungsfunktionsaustausch ihre Gültigkeit. Eine solche Dynamik würde die qualitative Herleitung der nucleosidischen Konformation aus den NOESY-Spektren nur dann in Frage stellen, wenn zusätzlich 'crosspeaks' beobachtet würden, die auf einen syn-Anteil schliessen liessen.

Die aus den COSY-Spektren qualitativ abschätzbaren Kopplungskonstanten zwischen den Protonen der Pyranosyl-Einheiten zeigen für alle drei Komplexe ein Muster, das nur mit der nach konformationsanalytischen Kriterien erwarteten Sessel-Konformation der Pyranose-Ringe vereinbar ist. Stets wird eine Abfolge von grossen Kopplungen H–C(1')→H_β–C(2')→H_α–C(3')→H–C(4')→H–C(5') beobachtet, während die übrigen vicinalen Kopplungen klein sind. Bestätigt wird diese Sessel-Konformation auch durch NOEs von H–C(1') nach H_α–C(3') und H–C(5').

Im Hinblick auf den in Homo-DNS-Duplexen kritischen, sterischen Kontakt zwischen der (C(2',3'))-Flanke der Pyranose-Ringe mit der Base der nachfolgenden Nucleotid-Einheiten sei hier auf die deutliche magnetische Abschirmung sämtlicher (H_α–C(2')) Protonen (mit Ausnahme der Nucleotid-Einheit am 4'-Ende!) hingewiesen (vgl. Tab. 3–5). Auch dieser Aspekt wird im Teil IV der Reihe [12] näher erörtert werden.

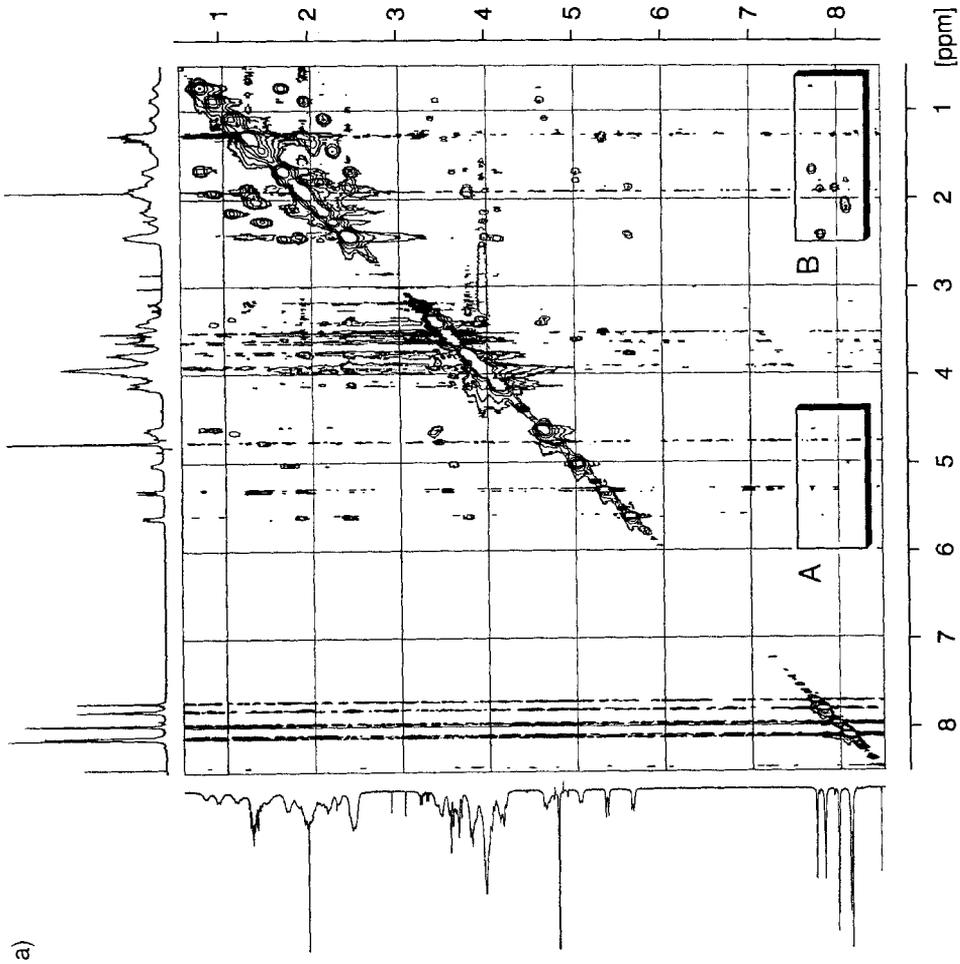


Fig. 28. a) $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum (400 MHz) des Duplexes von $\text{ddGlc}((\text{A-G})_3)$, b) Ausschnitte A und B*

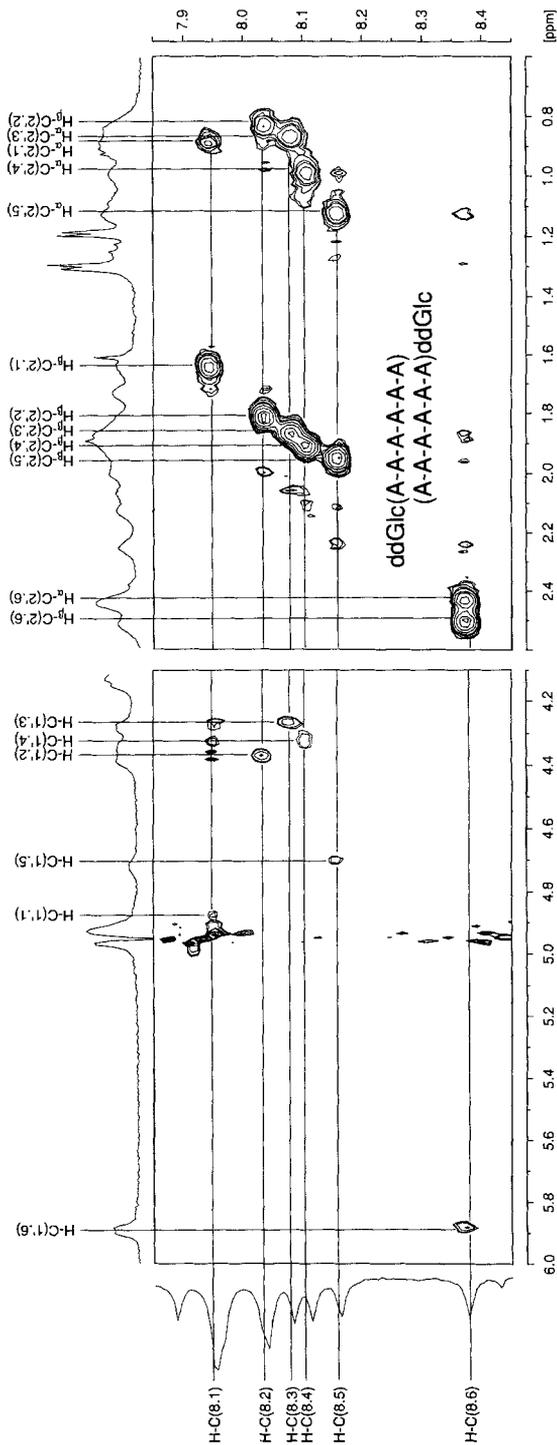


Fig. 29. Ausschnitte aus ($^1H, ^1H$)-NOESY-Spektrum (500 MHz) des Duplexes von *ddGlc(A₆)* *

* Subsection of the NOESY spectrum (500 MHz, t_{mix} 100 ms) of *ddGlc(A₆)*, showing the cross-peaks of H-C(8), H-C(1) and H-C(2'). Conditions are as given in Fig. 27a. Adenines in all nucleotide units are in the *anti*-conformation, according to the arguments discussed in the context of Fig. 28b. For the assignment of chemical shifts of non-exchanging protons, see Table 3 [5].

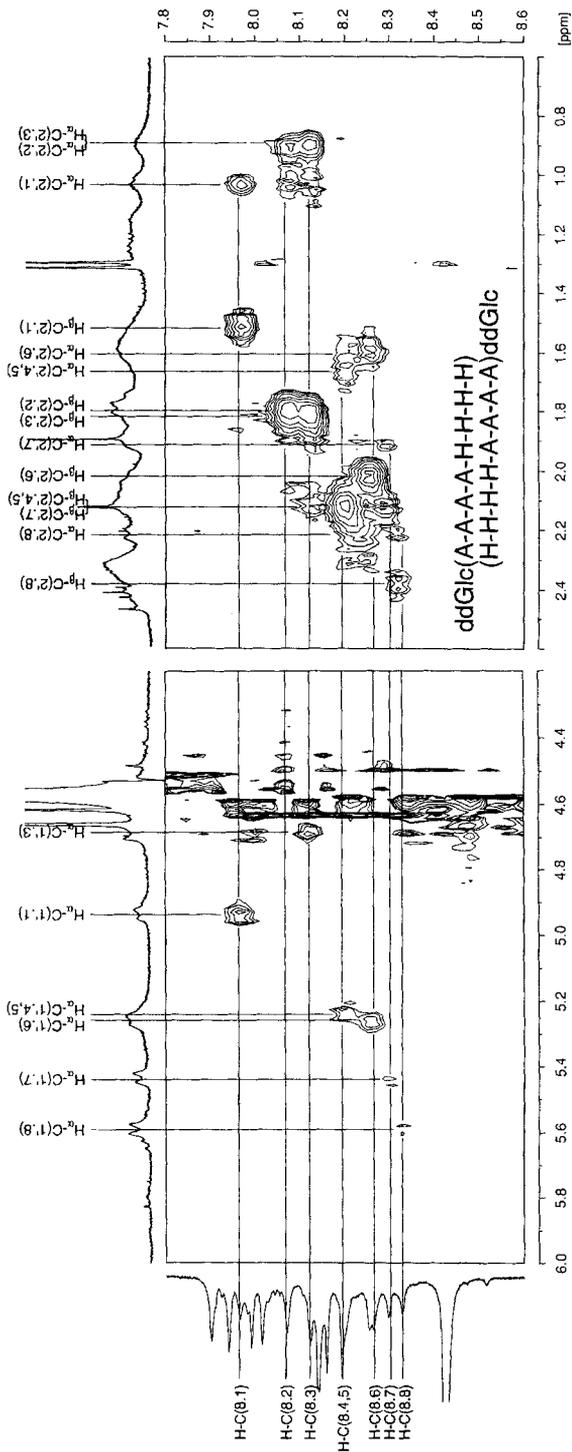


Fig. 30. Ausschnitte aus ($^1\text{H}, ^1\text{H}$)-NOESY-Spektrum (400 MHz) des Duplexes von ddGlc($A_A H_H$)^{*}

^{*}) Subsection of the NOESY spectrum (400 MHz, $t_{\text{mix}} = 60$ ms) of ddGlc($A_A H_H$) (5 mM ddGlc($A_A H_H$), 0.1M Na_2HPO_4 , H_3PO_4 , pH 7.0 in D_2O , 27°). All adenine as well as hypoxanthine nuclei are in the *anti*-conformation, according to the arguments discussed in the context of Fig. 28b. For the assignment of chemical shifts of non-exchanging protons, see Table 5.

4. Über geometrische Aspekte der Basenpaarung von (*quasi*-)linearen Oligonucleotid-Strängen. – Mit den im Teil I dieser Reihe abgeleiteten, idealisierten Konformationsmodellen von Homo-DNS-Einzelsträngen gehen einige geometrische Gegebenheiten einher, die dann augenfällig werden, wenn man die Geometrie der Paarung (idealisiert) linearer Oligonucleotid-Stränge betrachtet. Zwar sind diese Gegebenheiten für Oligonucleotid-Paarungen generell relevant, sie bleiben jedoch im komplexen Allgemeinfeld (z. B. bei der DNS-Paarung) verdeckt und treten dabei nur dann hervor, wenn man die (helikale) Paarung aus der Sicht linearer Bezugs-Konformationen zu analysieren versucht. Es ist deshalb hier der Ort, auf diese (an sich elementaren) geometrischen Aspekte der nucleotidischen Paarung kurz hinzuweisen. Des weiteren soll auch noch ein konformationeller Aspekt des 'reverse'-Hoogsteen-Paarungstyps behandelt werden, da dieser Paarungsmodus, wie die Ausführungen in den Kap. 3.2.1 und 3.2.2 gezeigt haben, bei den (Purin-Purin)-Paarungen in der Homo-DNS-Reihe eine besonders wichtige Rolle spielt.

Wie im Teil I dieser Reihe [1] dargelegt, führt eine qualitative Konformationsanalyse⁴⁴) eines Homo-DNS-Einzelstrangs zum bemerkenswerten Ergebnis, dass es im Rahmen der insgesamt nur drei Zulassungskriterien (sämtliche Einfach-Bindungen gestaffelt, 1,5-Repulsionen ausgeschlossen bzw. minimisiert, Konformation der Phosphodiester-Gruppierungen Anomereffekt-konform, d. h. *synclinal-synclinal*) einen einzigen Konformationstyp der Homo-DNS-Oligonucleotid-Kette gibt, nämlich den Typ *-sc,ap,sc,sc,ap,-sc* (Torsionswinkel $\alpha \rightarrow \zeta$; *Typ A* in *Schema 16*), dessen Nucleotid-Einheit nicht nur konstitutionell, sondern auch konformationell repetitiv ist und der damit die Voraussetzung für die Paarung zu Duplexen mit mono-nucleotischen Repetier-Einheiten erfüllt. Relaxiert man bei dieser Analyse das stereoelektronische Kriterium soweit, dass man für die Phosphodiester-Gruppierungen nicht nur eine *sc,sc-* (bzw. *-sc,-sc*)-Konformation, sondern auch eine *sc,ap-* (bzw. *-sc,ap-*), nicht aber eine *ap,ap*-Konformation zulässt (vgl. *Fig. 6* und *7* sowie Fussnote 19 in [1]), so ergibt sich ein zweiter, das genannte Paarungskriterium erfüllender Konformationstyp der Oligonucleotid-Kette, nämlich *ap,ap,ap,sc,ap,-sc* (*Typ B* im *Schema 16*).

Modelle von Homo-DNS-Oligonucleotid-Strängen der beiden (idealisierten) Konformationstypen *A* und *B* sind linear [1]. Bei ebenfalls idealisierter Konformation um die nucleosidische Bindung (Basenebene *synplanar* zur (H-C(1))-Bindung des Pyranose-Rings, Torsionswinkel $\chi = -120^\circ$ (*anti*) oder $+60^\circ$ (*syn*)) stehen die entlang der Oligonucleotid-Kette zueinander parallelen Basenebenen orthonogal zur mittleren Ebene der Pyranose-Sessel, jedoch geneigt zur Strang-Achse; das Mass dieser Neigung ist für die beiden Typen unterschiedlich.

An geometrisierten Modellen von linearen Strängen mit zueinander geneigten Strang- und Basenachsen (*Fig. 31*, oben) lässt sich der rein geometrische Grund erkennen, warum *quasi*-lineare Homo-DNS-Duplexe die antiparallele Strang-Orientierung gegenüber der parallelen Orientierung bevorzugen und dass sie dies um so ausgeprägter tun (sollten), je stärker die Neigung zwischen Strang- und Basenachsen ist.

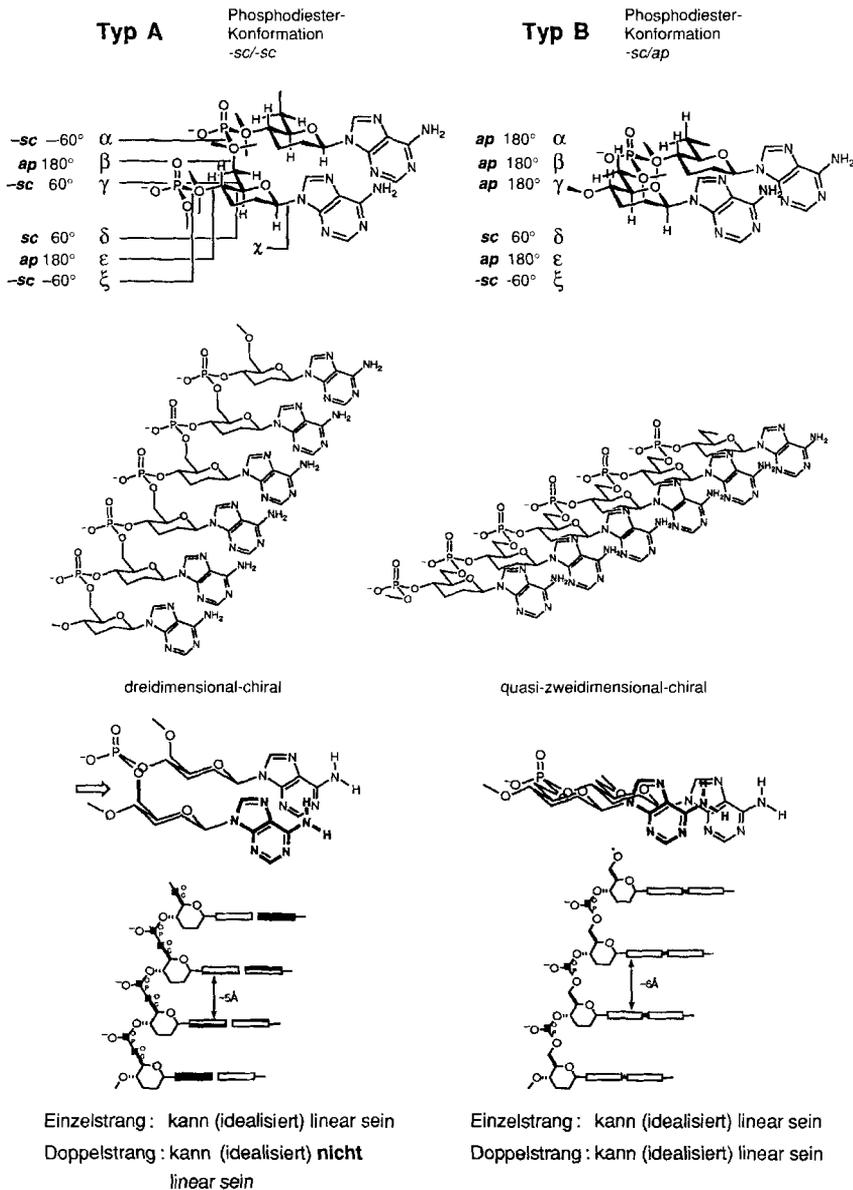
Sind idealisierte Modelle von Homo-DNS-Duplexen, die sich durch antiparallele Basenpaarung von linearen Einzelsträngen des Konformationstyps *A* oder *B* ableiten, ebenfalls linear? Die Antwort lautet bemerkenswerterweise für die Konformationstypen *A* und *B* unterschiedlich: *Homo-DNS-Duplexe, die sich durch Paarung von Einzelsträngen des (idealisierten) Konformationstyps A ableiten, haben eine (obligat entidealisierte) helikale Konformation, Duplexe aus Strängen des Konformationstyps B hingegen können (idealisiert) linear sein.* Der Grund für diesen Unterschied liegt darin, dass das (idealisiert) lineare Modell des Konformationstyps *A* paarungstopologisch *dreidimensional chiral* ist, das Modell mit dem Konformationstyp *B* sich jedoch als *quasi-zweidimensionale chirale Struktur* verhalten kann (*Fig. 31*, unten)⁴⁵). Wird zwischen linearen, dreidimensional-chiralen Strängen gleichen Chiralitätssinns⁴⁶) (durch die Paarungsaffinität der Basen) eine Paarung erzwungen, so hat zum Zwecke der Beibehaltung der Paarungsstruktur eine komplementär-helikale Verformung der Stränge zu erfolgen, was nur durch Entidealisierung der Strang-Konformation möglich ist.

Der Konformationstyp *A* einer Homo-DNS-Kette entspricht deshalb einem dreidimensional-chiralen Strang, weil in dieser (idealisierten) Konformation die von C(6') ausgehende Phosphodiester-Bindung *quasi-orthogonal* zur

⁴⁴) Vgl. auch den in Fussnote 17 im Teil II dieser Reihe [2] durch G. Quinkert (Frankfurt) ausgelösten Nachtrag zu dieser Analyse.

⁴⁵) Über die Begriffe zwei- und dreidimensionale Chiralität, vgl. Essays von Prelog [48a] und Wintner [48b].

⁴⁶) Für eine intra-komplexär racemische Paarung von zwei enantiomeren homochiralen Strängen mit paralleler Strang-Anordnung gilt Unterschiedliches: dreidimensional chirale Stränge paaren zu Duplexen, die um so eher linear sind, je geringer die Neigung der Stränge ist, d. h. je weniger die Ausrichtung der Basenpaarachsen relativ zur Strang-Achse von der orthogonalen Richtung abweicht. Im Rückblick dürfte dies der Grund für die zu Beginn der Untersuchungen über Homo-DNS gehegte Erwartung gewesen sein, dass ein Hexamer des D-Homo-deoxyadenosins bevorzugt mit dem Hexamer des L-Homo-deoxyuridins parallel paaren würde (vgl. Fussnote 8).

Schema 16. Konformationsanalyse des *ddGlc*-Einzelstrang-Rückgrats: idealisierte lineare Konformationen*)

*) This chapter discusses a few geometric aspects of oligonucleotide pairing which – although, *per se*, of an elementary nature – come to mind when pairing of (idealized) linear oligonucleotide strands in antiparallel strand orientation is considered. *Schema 16* recalls the two types of homo-DNA single strand conformation which are 'least strained' (allowing for both *sc/sc* and *ap/sc* phosphodiester groups) and are also conformationally repetitive (linear), and, therefore, capable of pairing (see Part 1 of this series [1] and also *Quinkert's* amendment in Part 2 (Footnote 17 in [2]). These two conformational models differ in one important respect, directly relevant to antiparallel pairing. Due to the presence of a C–O bond lying *quasi*-perpendicular to the

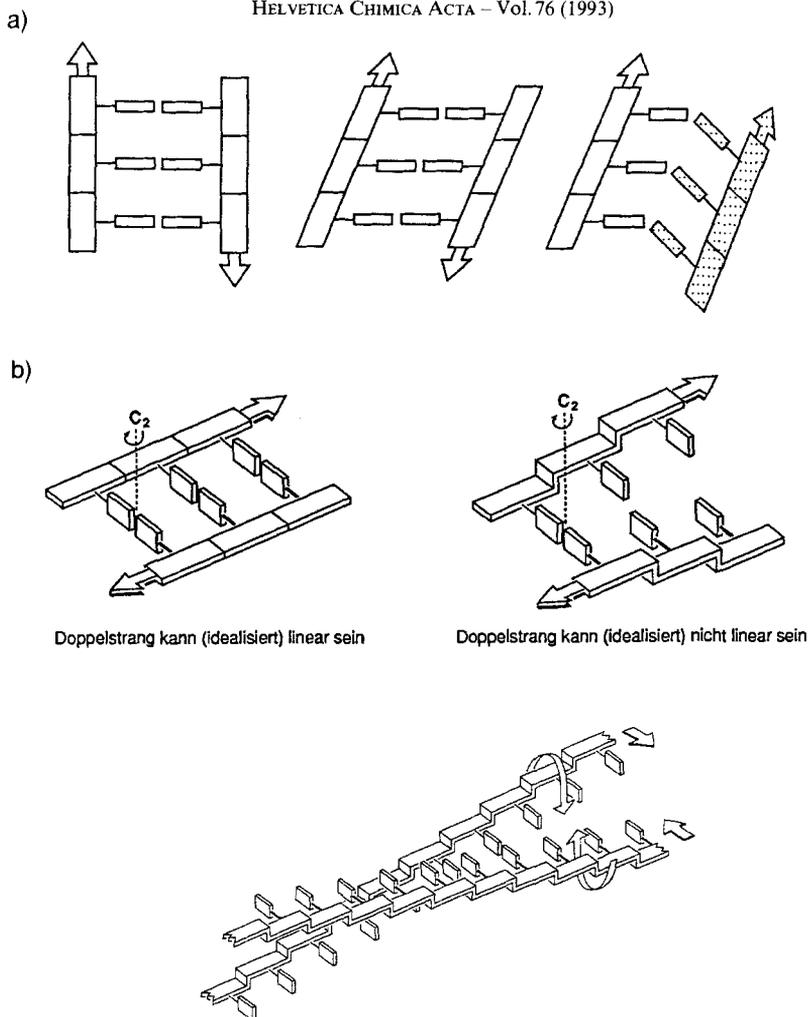


Fig. 31. a) Paarung bei antiparalleler vs. paralleler Strang-Orientierung. b) Helikalisierung von linearen *ddGlc*-Einzelstrang-Modellen bei Paarung in antiparalleler Strang-Orientierung*)

*) Visualization of why (idealized) linear oligonucleotide strands with inclined strand to base axes prefer *antiparallel* strand orientation in their duplexes, and of why such strands cannot form strictly linear duplexes when their conformation is three- (and not two-) dimensionally chiral.

strand axis, the *-sc/-sc* (type *A*) strand behaves as a three-dimensionally chiral system; it is *incapable* of forming a double strand in which the two strand axes are antiparallel and linear, as will be apparent from Fig. 31. In contrast, the *ap/-sc* (type *B*) strand, lacking the *quasi*-orthogonal C–O bond, can be regarded as a two-dimensionally chiral system, and thus *is* capable of linearly antiparallel double strand formation. When pairing is forced on the type *A* model, a helical twist (right-handed in the D-series) is the result, requiring deviations from the *linearity* values of torsion angles. The resulting helically distorted model is still *quasi*-linear.

mittleren Ebene liegt, welche die Strang-Achse und die zu dieser geneigte Achse der Basenpaare enthält. Eine derartige orthogonale Bindungsstufe fehlt im Strang-Modell des Konformationstyps *B* (Schema 16). Die an Modellen leicht zu erfahrende Tatsache, dass (homochirale) Homo-DNS-Stränge des Konformationstyps *A* nur unter Entidealisierung der Rückgrat-Konformation zu Duplex-Modellen mit antiparalleler Strang-Orientierung zusammengefügt werden können, Stränge des Typs *B* jedoch zwanglos idealisiert-lineare Duplex-Modelle abgeben, ist auf die An- bzw. Abwesenheit einer solchen orthogonalen Bindungsstufe in den zugehörigen Einzelstrang-Konformationen zurückzuführen. Die absolute Konformation der orthogonalen Bindung im Strang-Typ *A* bestimmt den Helizitätssinn des zugehörigen Duplex-Modells (rechtsgängig bei *D*-Konfiguration des Zucker-Bausteins), und die Relation der Länge dieser Bindung zur Repetier-Distanz entlang der Strang-Achse sowie vor allem auch die Anzahl solcher orthogonaler Bindungen bestimmen den Helikalisierungsgrad. Die bei einer einzigen orthogonalen Bindung pro Rückgrat-Einheit schwache Helikalisierung des Rückgrats kann sehr leicht durch Abweichung von Torsionswinkeln von ihrem Linearwert zustandekommen (vgl. hierzu auch Teil I [1]). Das Modell eines dergestalt helikalisierten Homo-DNS-Doppelstrangs erscheint im Vergleich zu einer DNS-Doppelhelix noch immer als *quasi*-linear.

In beiden idealisiert-linearen Homo-DNS-Einzelstrang-Konformationstypen *A* und *B* liegen die parallelen Basenebenen zu weit voneinander entfernt (*ca.* 5 Å bzw. *ca.* 6 Å), als dass in Paarungskomplexen die Basenpaar-Stapelung jenes Mass an Stabilisierung aufbringen könnte, das in DNS-Duplexen mit dem optimalen Basenpaar-Abstand von 3,5–4 Å einhergeht. In Fig. 32 sind in formalisierter Form die verschiedenen Typen von konformationellen Rückgrat-Verformungen dargestellt, welche die Distanz zwischen parallel gehaltenen Basenpaar-Ebenen eines *quasi*-zwei-dimensional chiralen, linearen Doppelstrangs mit orthogonalen Basenpaar-Achsen bei konstant bleibender 'konstitutioneller Distanz' der Rückgrat-Kette zu verringern geeignet sind. Eine Abweichung von der

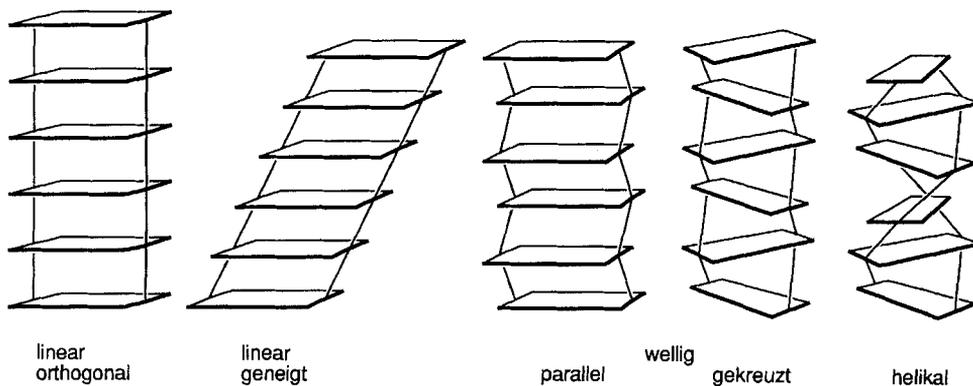


Fig. 32. Verkürzung der Basenpaar-Abstände in linearen Duplex-Modellen durch Neigung, Wellung oder Helikalisierung der Strang-Achsen*)

*) The distance between the base planes in the two idealized homo-DNA single strand models of Scheme 16 is *ca.* 5 Å for type *A* and 6 Å for type *B*, in each case considerably greater than the 3,4 Å known to be optimal for base stacking in paired DNA oligonucleotides. The cartoons of Fig. 32 indicate types of backbone deformation available for adjusting base plane distance within the constitutional constraints of the backbone. With respect to a reference model having linear (anti)parallel strands and orthogonally attached base pairs, lower base pair distances can be attained by inclining the backbone axes, to a degree that is determined by the backbone constitution, and is strongly dependent on the backbone's conformation. Alternatively, the backbone axes may be ruffled, while the base-pairing axes are either parallel or crossed. Finally, helicalization can provide the adjustment in a most efficient manner and, indeed, it is the solution chosen by Nature to achieve the optimal stacking distance between base pairs, given the constitutional constraints of the DNA backbone. The type and degree of helicalization required for optimal base-pair-stacking distances in DNA duplexes coincide with the intrinsic predisposition of the DNA single-strand back-bone, which is – to an important part – a consequence of the furanose structure of the sugar (see discussion in part I [1]).

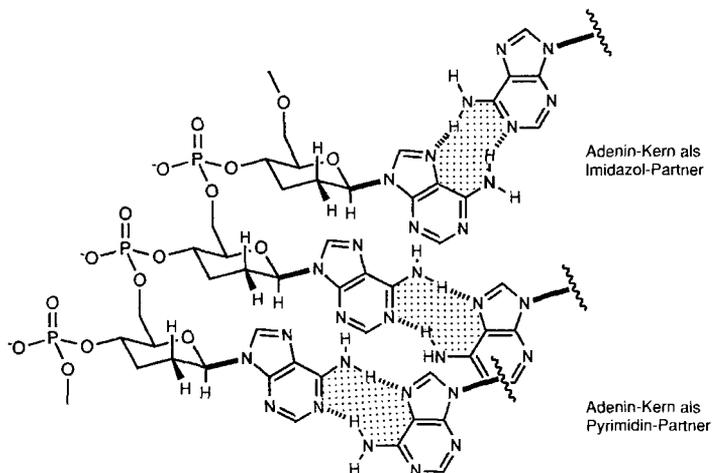
(fiktiven) orthogonalen Strang-Linearität durch Strang-Neigung ist bei Homo-DNS-Oligonucleotiden schon konstitutionell durch die (4'→6')-Position der Phosphodiester-Verknüpfung und deren Lage relativ zur nucleosidischen Bindung bedingt. Das Ausmass der Strang-Neigung ist aber vor allem auch konformationell bestimmt, wie dies die Einzelstrang-Modelle der Konformationstypen *A* und *B* in *Schema 16* zum Ausdruck bringen. Dadurch, dass der Basenabstand im *A*-Typ geringer ist als im stärker geneigten *B*-Typ, illustrieren diese beiden Modelle den dominierenden Einfluss der Rückgrat-Konformation auf den Basenabstand. Dies betrifft auch die Konformation um die nucleosidische Bindung, bei welcher eine Variation des Torsionswinkels χ im Bereiche von -120° (*anti*)→ $+60^\circ$ (*syn*) bei linearen Strängen *formal* jede beliebige Verringerung des (orthogonalen) Abstands der Basenebenen herbeiführen kann, wobei allerdings in der Realität sterische Faktoren unter Umständen rigoros intervenieren, und Basenebenen ihre gegenseitige Stapel- und Paarungs-Orientierung verschlechtern können.

Der wichtigste und wohl effizienteste Weg zur konformationellen Verringerung des Basenabstandes im Konstitutionstyp eines oligonucleotidischen Rückgrats ist die Helikalisierung. Durch sie bringt das Rückgrat der natürlichen DNS ungezwungen den für eine Stapelung der Basenpaare in Duplexen optimalen Abstand von ca. 3,5 Å zustande. Wiewohl im Einzelnen komplex und keinesfalls etwa voll durchschaut, ist dort die helikale Form – wie im Teil I dieser Reihe [1] dargelegt – durch die Fünfgliedrigkeit des Furanose-Rings dem Rückgrat immanent.

Von den zwei verbleibenden in *Fig. 32* angedeuteten Rückgrat-Verformungen erheischt noch der Typ der welligen Verformung unsere Aufmerksamkeit, und zwar im Hinblick auf die in der Homo-DNS-Reihe besonders heimischen (Purin-Purin)-Paarungen des 'reverse'-*Hoogsteen*-Typs.

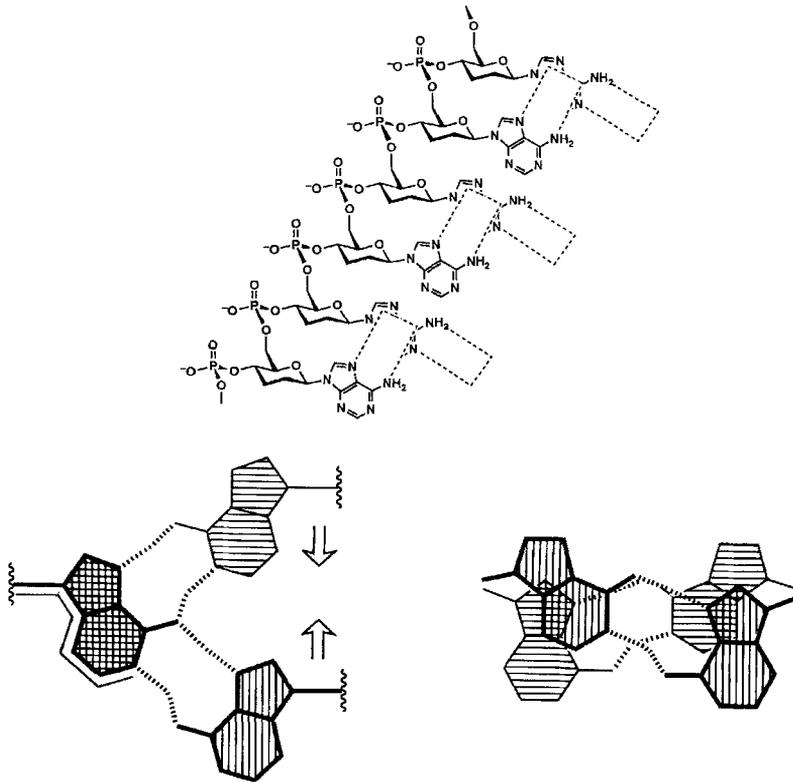
Wie in *Schema 17* für den Fall der (A/A)-Paarung illustriert, gibt es für jeden Purin-Kern entlang der Rückgratkette eines ddGlc(A_n)-Duplexes zwei konformationelle Varianten, die den beiden Funktionen entsprechen, die ein Adenin-Kern in einem 'reverse'-*Hoogsteen*-Basenpaar erfüllen kann: entweder agiert er als 'Amidin-Partner' oder als 'Imidazol-Partner'. Diese beiden Funktionsvarianten verlangen eine unterschiedliche Verankerungs-Richtung des Paarungspartners im Oligonucleotid-Rückgrat. Art und Ausmass der damit einhergehenden konformationellen Verformung (Anpassung) der Rückgrat-Kette wird davon abhängen, ob und wie die beiden

Schema 17. Funktionelle Dichotomie bei der (Adenin/Adenin)-Paarung*)



*) The backbone ruffling mode with crossed base pairing axes (*Fig. 32*) relates to a constitutional aspect of purine-purine pairing. The 'reverse'-*Hoogsteen* mode assigned to the two purine partners of a pair (adenine in *Schema 17*) demands two constitutionally distinct functions of the purine – it must play the role of either the pyrimidine or the imidazole partner – requiring different topologies at the sugar-base anchor of the backbone. How these dichotomous functions are distributed along the oligonucleotide chain in duplexes, e.g., in ddGlc(A₆) and dd((A-G)₃), is not known; NMR spectroscopy (see *Fig. 27–29* and *Tables 3 and 4*) reveals C₂ symmetry in both of these duplexes, implying that the exchange of pairing functions of the individual purine bases is rapid with respect to the NMR time scale.

Schema 18. Funktionelle Dichotomie bei der (Adenin/Adenin)-Paarung: Basenverankerung bei regulärer Alternanz*)



- *) Regular alternation of the dichotomous pairing functions of adenine nuclei in $ddGlc(A_n)$ duplexes would require alternating complementary adjustment of the base anchoring at the backbone. This type of backbone ruffling with crossed base pair axes may be of importance in purine-purine paired homo-DNA duplexes, in that it may help ease the steric clash, between the equatorial H_x at $C(2')$ of the pyranose ring and the plane of the imidazole part of the neighboring adenine, when the distance between base pair planes is decreasing.

Funktions-Varianten des Adenin-Kerns innerhalb derselben Rückgrat-Kette alternieren. Eine reguläre Alternanz (Schema 18) würde die beiden Rückgrat-Ketten komplementär zu einer Verformung veranlassen, welche in ihrem Typ der in Fig. 32 aufgeführten gekreuzt-welligen Verformung entspräche.

Analoges wie für die (A/A)-Paarung gilt auch für die (G/G)-Paarung in $ddGlc(G_n)$ sowie für die alternierenden (Purin-/Purin)-Paarung in Oligonucleotiden des Typs $ddGlc((A-G)_3)$. Die NMR-Spektroskopie hat weder bei $ddGlc(A_6)$ noch bei $ddGlc((A-G)_3)$ Aufschluss über die Frage gegeben, ob in diesen Duplexen Paarungsfunktions-Alternanz auftritt oder nicht; in beiden Fällen verhalten sich die beiden Stränge des Paarungskomplexes 1H -NMR-spektroskopisch unter den verwendeten Mess-Bedingungen isochron, was durchaus auch mit einem gegenüber der NMR-Zeitskala rasch erfolgenden Wechsel der Paarungsfunktion der einzelnen Purin-Basen vereinbar ist.

Modellbetrachtungen weisen darauf hin, dass Paarungsfunktions-Alternanz bei (Purin-Purin)-Paarungen nach dem 'reverse'-Hoogsteen-Modus in die Reihe der Hexopyranosyl-Oligonucleotide sehr wohl ein bevorzugtes Struktur-Muster darstellen könnte. Mit einem solchen Muster ginge eine Alternanz der Rückgrat-Verformung einher, die einerseits – wie oben erörtert – eine Annäherung der Basenpaar-Ebenen herbeiführen und andererseits im Verein mit einer Alternanz der räumlichen Ausrichtung der Basen den in Hexapyranosyl-oligonucleotid-Duplexen kritischen Kontakt zwischen dem Pyranose-Ring und der sequentiell nachfolgenden Base beeinflussen würde. Dieser Kontakt betrifft vor allem das in $2'$ -Stellung des Pyranose-Rings äquatorial stehende H-Atom, dessen

Bindungsrichtung direkt in den Bezirk der in 4'-Richtung liegenden Nachbarbase weist⁴⁷⁾ (Schema 17 und 18). Eine alternierende Ausscherung von Pyranose-Ringen und Basen senkrecht zur Duplex-Achse würde die gegenseitige Lage der Kontaktpartner verändern und dadurch die dem Struktur-Typ immanente, repulsive Wechselwirkung gegebenenfalls verringern.

Helikalisierung eines Oligonucleotid-Rückgrats entspricht einer *konsekutiv gleichgerichteten* (statt alternierenden) Ausscherung von Zucker-Bausteinen und Basen senkrecht zur Duplex-Achse. Dies ist einer der Gründe, warum in der natürlichen Reihe die Frage nach dem Kontakt zwischen Zucker-Bausteinen und sequentiell nachfolgenden Basen nicht kritisch ist. Es ist dies eine Frage, die spezifisch für tendenziell lineare Oligonucleotid-Paarungskomplexe in der Reihe der Hexose-Nucleinsäuren akut erscheint (vgl. Kap. 5).

5. Struktur- und Paarungseigenschaften von DNS- und Homo-DNS-Oligonucleotiden im Vergleich. – *Die Ergebnisse der vorstehend beschriebenen Untersuchungen verschaffen uns erstmals eine experimentell umfassend dokumentierte Kenntnis von Art und Ausmass der Bedeutung, welche der Struktur des Zuckerphosphat-Bausteins für das Paarungsverhalten der natürlichen DNS zukommt.* Diese Kenntnis ist nach einer in der Chemie durchaus selbstverständlichen Vorgehensweise gewonnen, dadurch nämlich, dass man physikalische und chemische Eigenschaften einer Substanzklasse nicht *ab initio* herzuleiten versucht, sondern sie systematisch auf entsprechende Eigenschaften von problemgerecht ausgewählten Vergleichsstrukturen bezieht und Eigenschaftsunterschiede mit Strukturunterschieden korreliert.

Es sind hauptsächlich drei strukturelle Eigenschaften der DNS, deren Abhängigkeit von der Natur des Zuckerphosphat-Bausteins durch den Bezug auf die Homo-DNS manifest wird, nämlich die Helizität der Duplex-Strukturen, der mit Bezug auf die Basenpaar-Stapelung optimale Basenabstand, und schliesslich die konformationelle Flexibilität des Zuckerphosphat-Rückgrats.

Im Teil I dieser Reihe [1] ist dargelegt worden, wie sich die für DNS-Duplexe⁴⁸⁾ charakteristische Doppelstrang-Helizität aus der Sicht einer (idealisiert) linearen Homo-DNS-Bezugsstruktur präsentiert. Der dort begründeten, entscheidenden Rolle der Fünfgliedrigkeit des Furanose-Rings ist hier im Anschluss an das im Kap. 4 Besprochene nachzutragen, dass die DNS-Stränge sowohl in ihrer *A*- als auch *B*-Form dem Typ der *dreidimensional-chiralen* Stränge angehören und dass damit deren Paarung schon aus rein geometrischen Gründen selbst auch dann eine (bei *D*-Konfiguration der Zucker – *ceteris paribus* – rechtsgängige) helikale Verformung der Paarungspartner voraussetzen würde, wenn keine anderen Faktoren eine solche herbeiführten. Indessen zeigt eine am Homo-DNS-Modell mögliche Abschätzung des Ausmasses einer solcherart paarungstopologisch bedingten Helikalisierung, dass die Abweichung des endocyclischen Torsionswinkels δ von seinem Linearwert der weitaus effizientere Helikalisierungsfaktor darstellt. Die vollumfängliche Bedeutung der Furanose-Struktur des Zucker-Bausteins für die Helizität der DNS wird dann definitiv und augenfällig dokumentiert sein, wenn Röntgenstruktur-Analysen von Homo-DNS-Oligonucleotid-Duplexen vorliegen. Wie weit die NMR-Spektroskopie zur Zeit hiezu beizutragen imstande ist, wird Teil IV dieser Reihe [12] umschreiben.

⁴⁷⁾ An indirekten experimentellen Beobachtungen, welche auf die kritische Rolle dieser Kontaktregion für die Struktur von Hexopyranosyl-oligonucleotid-Duplexen hinweisen, gibt es bereits mehrere; über ¹H-NMR-spektroskopische Anzeichen vgl. Kap. 3.2.3 und Teil IV der Reihe [12] (vgl. auch Fussnote 52).

⁴⁸⁾ Dies betrifft *A*- und *B*-DNS, nicht aber die (linkshelikale) *Z*-DNS [49], die nicht eine mono-, sondern eine dinucleotidische Repetier-Einheit aufweist.

Auch der *Abstand der Basenpaarebenen* in Duplexen von Homo-DNS-Oligonucleotiden gehört zu den strukturellen Eigenschaften, deren Kenntnis die Röntgenstrukturanalyse eines Homo-DNS-Paarungskomplexes voraussetzt; Duplex-Helizität und Basenabstand sind – wie in *Kap. 4* mit *Fig. 32* angedeutet – geometrisch aufs engste miteinander verknüpft. Von einer solchen Analyse erwartet man u. a. Aufschluss über die Frage, ob und inwieweit das Homo-DNS-Rückgrat den im linearen Bezugsmodell für eine ideale Basen-Stapelung viel zu grossen Basenabstand von *ca. 5 Å* durch Helikalisierung zu verringern versucht, und wie die Struktur gegebenenfalls das Problem der mit einer Verringerung des Basenabstandes aufkommenden sterischen Behinderung zwischen dem Zucker und der benachbarten, im Duplex sequentiell nachfolgenden Base löst (vgl. die diesbezügliche Diskussion im Teil IV [12]).

Über die konformationelle *Flexibilität* der Furanose-Ringstruktur der Zuckerphosphat-Bausteine von DNS (sowie RNS) existiert eine umfangreiche Literatur sowohl theoretischen als auch experimentellen Inhalts [15] [50]. Aus einer Arbeit von *Levitt* und *Warshel* [50b] ist in *Fig. 33* eine (berechnete) Information herausgegriffen, die das We-

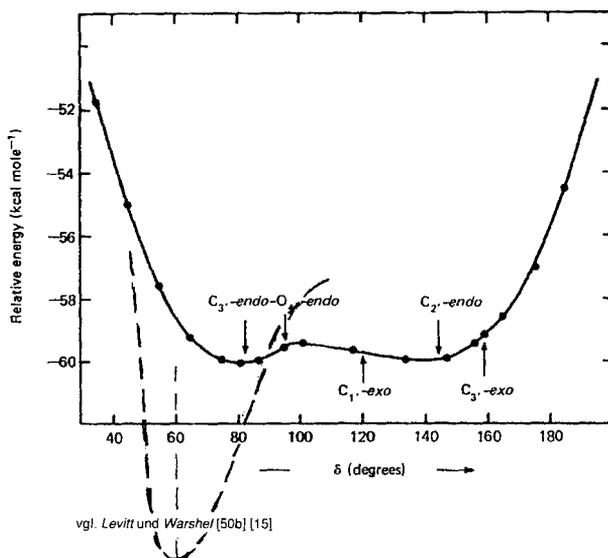


Fig. 33. Konformationelle Beweglichkeit des Furanose-Rings vs. konformationelle Starrheit des Pyranose-Rings*)

*) Among the three factors in terms of which the difference in pairing behavior between homo-DNA and DNA are to be rationalized (helical vs. *quasi*-linear backbone, optimal vs. too large base-stacking distance, flexible vs. rigid sugar ring), the two structural factors are closely related, and are more transparent with respect to their consequences than is the factor concerning the conformational dynamics of the sugar ring. *Fig. 33* reproduces a (calculated) potential energy curve of the 2-deoxyribofuranose ring, taken from [50b], meant to allow qualitative visualization of the wide conformational space between the ring's C(3')-*endo*- and C(2')-*endo*-conformations, similar in energy and separated by only a small interconversion barrier. Added to the *Figure* is (hand drawn) the type of curve that qualitatively describes the conformational rigidity of the hexopyranose ring, assuming that the homo-DNA pyranose chair (*Fig. 34*), with its three equatorial substituents, will not exist in its inverted form. Homo-DNA lacks the free ring inversion that provides DNA with its great structural flexibility.

sentliche der konformationellen Beweglichkeit des Ribofuranose-Strukturelements in den natürlichen Nucleinsäuren anschaulich andeutet, nämlich die Existenz eines Konformationsraums mit energetisch geringfügig, räumlich jedoch ausgeprägt unterschiedlichen Ring-Konformationen, in welchen die bezüglich der räumlichen Anordnung der Substituenten stark voneinander abweichenden C(3')-endo und C(2')-endo-Konformationen (vgl. Fig. 34) praktisch isoenergetisch und durch eine flache, quasi-Ringumklappungs-Barriere voneinander getrennt sind. Der Potentialkurven-Typ, der auf analoge Weise den weitaus engeren Konformationsraum des Pyranose-Rings der Homo-DNS wiedergibt, ist in der Figur zusätzlich eingetragen⁴⁹⁾; er entspricht qualitativ dem Umklappungspotential eines Cyclohexanring-Sessels und weist demzufolge ein gegenüber dem Fünfring-Potentialplateau um ca. 6 kcal/mol steil abgesenktes Minimum beim Torsionswinkelwert $\delta \sim 60^\circ$ auf. Die konformationelle Flexibilität des Furanose- (und Cyclopentan-) Rings entspricht der Flexibilität des energiereichen Ensembles der Twist-Wannen-For-

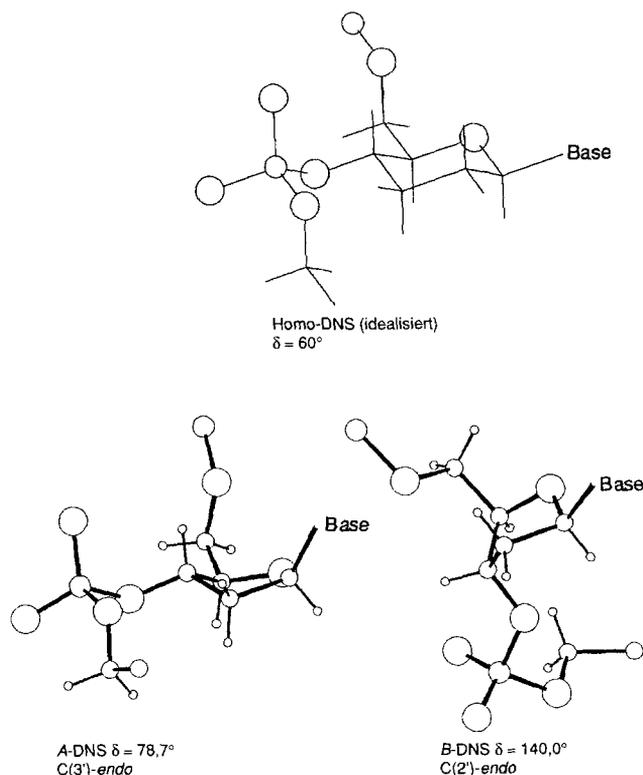


Fig. 34. Idealisiertes Homo-DNS-Modell im Vergleich zur Konformation von Nucleotid-Einheiten in *d*-Oligonucleotiden des A- und B-Typs*)

*) Idealized conformation of a homo-DNA oligonucleotide unit compared with X-ray data from A-DNA- and B-DNA-type oligo-2'-deoxyribonucleotide conformations (taken from Fig. 17 in [1]).

⁴⁹⁾ Die Kurve ist rein qualitativ (handschriftlich) eingetragen.

men des Pyranose (und Cyclohexan)-Rings (vgl. Schema 5 in [1]); Ring-Flexibilität geht entweder mit konstitutionell (bei 5ringen) oder konformationell (bei 6ringen) bedingter Ring-Spannung einher. Der kaum behinderten Umklappung des Furanose-Rings zwischen der C(3')-endo- und der C(2')-endo-Konformation bei der DNS (Übergang von A- zu B-DNS und umgekehrt, vgl. Fig. 34) steht die starre, weil durch die drei äquatorialen Substituenten thermodynamisch fixierte Pyranosesessel-Konformation der Homo-DNS gegenüber. Einer Homo-DNS mit Pyranose-Ringen in dieser Sessel-Form fehlt das strukturelle Scharnier der Ring-Umklappung, das dem Rückgrat der natürlichen DNS die enorme konformationelle Beweglichkeit und Breite verleiht.

Duplex-Helizität, optimaler Basenabstand und Rückgrat-Flexibilität sind die hauptsächlichsten Eigenschaften des DNS-Strukturmodells, die beim Übergang zum Homo-DNS-Modell sich drastisch ändern; es sind dies somit auch die Struktur-Eigenschaften, deren Veränderung mit beobachteten Unterschieden im Paarungsverhalten von Oligonucleotiden der DNS- und Homo-DNS-Reihe in Beziehung zu bringen sind. Es betrifft dies die generell höhere thermodynamische Stabilität der Homo-DNS-Duplexe mit der Tatsache ihres dominant entropischen (und nicht enthalpischen) Ursprungs sowie die unterschiedliche Hierarchie der Basenpaarungen, die mit sich bringt, dass die Paarungsregeln der DNS-Reihe von den Paarungsregeln der Homo-DNS-Reihe verschieden sind. Der direkte Vergleich der Lage der (Einzelstrang \rightleftharpoons Doppelstrang)-Gleichgewichte zwischen DNS- und Homo-DNS-Reihe muss sich auf die (Purin-Pyrimidin)-Paarungen beschränken, da die bei Homo-DNS-Oligonucleotiden zu beobachtenden (Purin-Purin)-Paarungen bei DNS-Oligonucleotiden gleicher Basensequenz entweder zu schwach sind, um unter den Mess-Bedingungen beobachtbar zu sein (gilt vermutlich für die (Adenin-Adenin)-Paarung) oder durch Wechselwirkungen überdeckt sind, welche mit dem in der Homo-DNS-Reihe beobachteten Paarungstyp nicht direkt verglichen werden können ((Guanin-Guanin)-Paarung). Dieser Sachverhalt dürfte für die (Purin-Purin)-Paarung letztlich Ausdruck des gleichen Unterschieds sein, wie er bei der (Purin-Pyrimidin)-Paarung durch direkten Vergleich feststellbar ist, dass nämlich Paarungsgleichgewichte in der Homo-DNS-Reihe generell stärker auf der Seite der Paarungskomplexe liegen als in der DNS-Reihe.

Hinter jeglichem Versuch einer Deutung der Unterschiede in den thermodynamischen Daten der Duplexierung von DNS- und Homo-DNS-Oligonucleotiden hat die Einsicht zu stehen, dass diese Unterschiede letztlich das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels zahlreicher, nicht zuletzt auch das Lösungsmittel miteinbeziehender Faktoren darstellen und dass deshalb jegliche anscheinend einfache, durch Plausibilität sich in den Vordergrund drängende Deutung tentativ ist. Eine solche in den Vordergrund sich drängende Vorstellung ist die Annahme, dass die entropisch bedingte, höhere Stabilität der Homo-DNS-Duplexe vor allem die Folge eines höheren Grades an konformationeller Präorganisation des Einzelstrangs auf die Doppelstrang-Struktur hin darstellt, in anderen Worten, dass die belegten Konformationsräume der Einzel- und Doppelstränge in der Homo-DNS-Reihe einander ähnlicher sind als in der DNS-Reihe.

Dass konformationelle Präorganisation der Einzelstränge einen wesentlichen Teil der Paarungsbereitschaft von sowohl Homo-DNS- als auch DNS-Einzelsträngen ausmachen dürfte, war eine der Folgerungen der im Teil I dieser Reihe dargelegten, qualitativen Konformationsanalyse des Homo-DNS-Einzelstrangs gewesen. Die Folgerung hatte sich daraus ergeben [1], dass es unter den insgesamt $2 \cdot 3^3$ möglichen (idealisierten) Konforma-

tionstypen einer Homo-DNS-Mononucleotid-Einheit im Rahmen der verwendeten Selektionskriterien (vgl. [1] und Kap. 4) einen einzigen gibt, der konformationell repetitiv und damit paarungsbereit ist, dass dieser Konformationstyp zum Ensemble der (insgesamt vier⁴⁴) geringst gespannten Rückgrat-Konformationstypen gehört und dass es schliesslich eben dieser Konformationstyp ist, der generell im Rückgrat von *DNS-Duplexen des A-Typs* vorkommt (*-sc,ap,sc,sc,ap,-sc*, vgl. *Schema 16* und *Fig. 34* sowie [51] [1]). Da Gang und Ergebnis der für den Homo-DNS-Einzelstrang durchgeführten Konformationsanalyse im wesentlichen unverändert auch für einen DNS-Einzelstrang gelten würden, dessen Furanose-Ringe man in der dem Pyranose-Sessel ähnlichen C(3')-endo-Konformation festhielte, war zu folgern, dass in Homo-DNS-Duplexen das Rückgrat den gleichen Konformationstyp aufweisen werde wie in der *A-DNS*. Aus solcherart vereinfachter Sicht würden sich das Homo-DNS- und DNS-System darin unterscheiden, dass der Konformationsraum eines Homo-DNS-Einzelstrangs sich (in jeder Mononucleotid-Einheit) über den Bereich der vier geringst gespannten Konformationstypen mit durchgehend gleicher (*quasi-starrer*) Pyranosering-Konformation erstreckt, während der Konformationsraum eines DNS-Einzelstrangs sich in allen diesen Rückgrat-Konformationen auch auf das gesamte Ensemble der *quasi-isoenergetischen* Furanose-Konformationen ausdehnt.

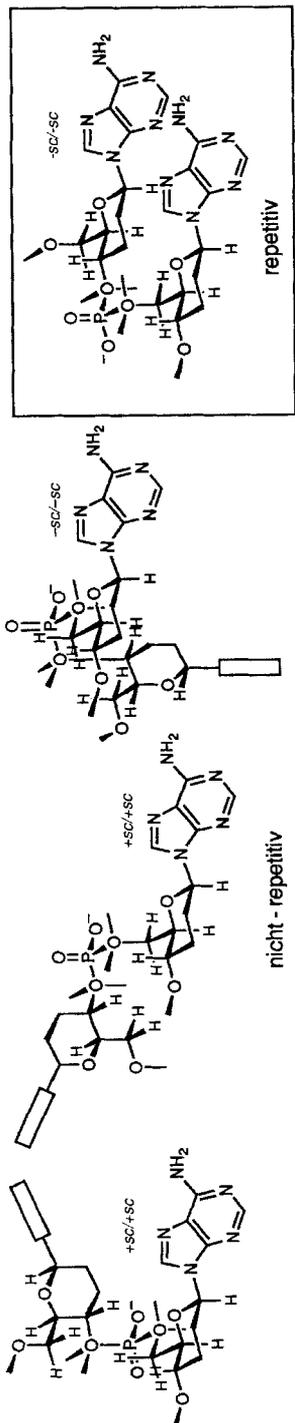
Eine konformationsanalytische Abschätzung konformationeller Präorganisation versucht, mit faktorisierenden energetischen Kriterien die Belegung des Konformationsraumes einer Edukt-Struktur mit Bezug auf den fixierten Konformationstyp des Produkts zu erfassen. Dass solches für einen so komplexen Struktur-Typ wie jenen der (Homo-DNS- und A-DNS-) Oligonucleotide überhaupt möglich und zudem nützlich sein soll, scheint eher überraschend, doch darf jedenfalls der Kern des Resultats der Analyse als bemerkenswert gelten, dass nämlich der in *A-DNS-Duplexen* beobachtete (durch Paarung *quasi-fixierte*) Rückgrat-Konformationstyp mit Hilfe von nur drei konformationellen Kriterien als einer der nur vier⁴⁴) geringst gespannten Einzelstrang-Konformationstypen erkannt wird und dass darüber hinaus dieser Konformationstyp auf Grund eines zusätzlichen (paarungstopologischen) Kriteriums sich unter diesen vier als der einzig paarungsfähige erweist.

Eine schon an sich erkennbar gewesene, nun aber in Kenntnis des Gangs der im Teil IV [12] zu behandelnden NMR-spektroskopischen Strukturanalyse des Duplexes von ddGlc(A₅-T₅) besondere Aufmerksamkeit erheischende Schwachstelle der mit den erwähnten drei Selektionskriterien (vgl. Kap. 4 und [1]) durchgeführten Homo-DNS-Konformationsanalyse ist das auf empirische Befunde sich stützende (vgl. Fig. 7 in [1]) und mit stereoelektronischen Argumenten gerechtfertigte 'Verbot' von Phosphodiester-Konformationen, die nicht dem *sc,sc*- (bzw. *-sc,-sc*)-Typ angehören. Diese Einschränkung enthält eine Komponente von Willkür, deren Gewicht wir weder aus Literaturangaben [52] noch aus eigenen Beobachtungen⁵⁰) genauer angeben können, und die deshalb im Zusammenhang mit den hier vorgebrachten Vorstellungen über die konformationelle Präorganisation der Homo-DNS- (und DNS)-Einzelstränge eine Erörterung verlangt. Lässt man die Einschränkung so weit fallen, dass man bei der Analyse auch Phosphodiester-Konformationen des ($\pm sc,ap$)-Typs (nicht aber des (*ap,ap*)-Typs, vgl. Fig. 7 in [1]), zulässt, so sind zusätzlich insgesamt sechs weitere Rückgrat-Konformationstypen erlaubt, von wel-

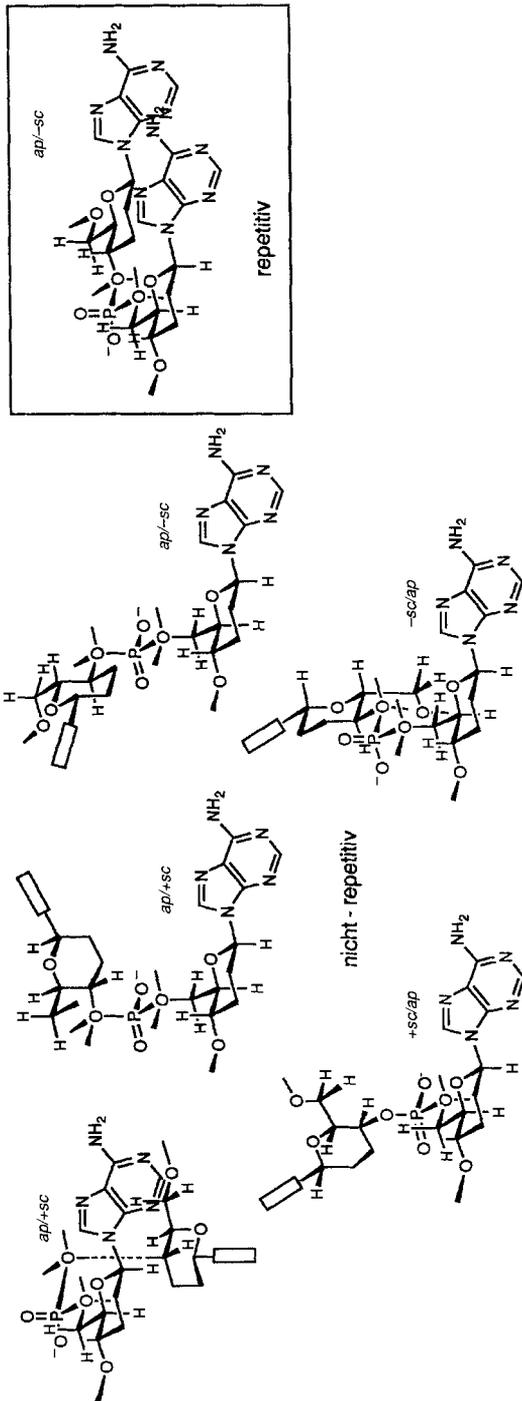
⁵⁰) Vgl. die Erörterungen über die Struktur des Duplexes von ddGlc(A₅-T₅) in [12].

Schema 19. Qualitative Konformationsanalyse des Homo-DNS-Einzelstrangs: Zusammenfassung des Ergebnisses*)

Phosphodiester-Konformationen $-sc/-sc$ und $+sc/+sc$



Phosphodiester-Konformationen $ap/\pm sc$ und $\pm sc/ap$



chen, wie bereits oben im Zusammenhang mit *Schema 16* erörtert (vgl. auch [1], S. 239⁵¹)), wiederum eine einzige konformationell repetitiv und damit paarungsfähig ist. Aus der Sicht einer solcherart erweiterten Analyse bestünde die konformationelle Präorganisation eines Homo-DNS-Einzelstrangs darin, dass unter insgesamt $2 \cdot 3^5$ zu betrachtenden (idealisierten) Rückgrat-Konformationen einer Rückgrat-Nucleotid-Einheit ein Ensemble von deren zehn 'erlaubt' ist. (*Schema 19*) und dass dieses Ensemble zwei paarungsber-eite Einzelstrang-Konformationstypen in sich schliesst (je eine mit *(-sc,-sc)*- bzw. *(sc,ap)*-Phosphodiester-Gruppierung), die zwei möglichen Varianten der (idealisierten) Rückgrat-Konformation eines Homo-DNS-Doppelstrangs entsprechen.

Präorganisations-Vergleiche zwischen DNS- und Homo-DNS, die der Realität näher lägen als die einer qualitativen Konformationsanalyse, wären von beträchtlichem Interesse, u. a. im Hinblick auf die wichtige Frage nach dem relativen Gewicht der strukturbestimmenden Faktoren, die für den Struktur-Typ der DNS-Doppelhelix massgebend sind. Im besonderen interessiert die Frage, inwieweit die Anlage zur Doppelhelix dem Struktur-Typ des Oligonucleotid-Einzelstrangs immanent ist, d. h. inwieweit das Rückgrat – abgesehen von Basenpaarung und Basenstapelung – kraft konformationeller Präorganisation von sich aus die Bildung der Doppelhelix zu begünstigen prädestiniert ist. Ein Beitrag in diesem Zusammenhang ist kürzlich durch *Vesnaver* und *Breslauer* [53] gemacht worden, die aus thermochemischen Beobachtungen zum Schluss kamen, dass DNS-Einzelstränge (bei tiefer Temperatur) eine intramolekulare Strukturierung aufweisen können, deren Enthalpie einen beträchtlichen Teil der Denaturierungsenthalpie der Duplex-Struktur (bei höherer Temperatur) ausmacht ('... *near room temperature, single strands can possess order that enthalpically – albeit not necessarily structurally – prepare them for duplex formation.*') [53]. Die in dieser Feststellung mit problemgerechter Vorsicht ausge-

⁵¹) In [1] sind von diesen sechs Konformationen nur deren vier formuliert.

zu *Schema 19*

*) The intuitively appealing proposal is made, that the higher entropic stability of homo-DNA duplexes relative to DNA duplexes is – in part – a consequence of a higher degree of conformational preorganization of the homo-DNA single strand toward the duplex structure. A justification of this suggestion must compare the duplex conformation with the ensemble of the thermodynamically most stable single strand conformers. *Scheme 19* outlines such a comparison on the level of qualitative conformational analysis, as discussed in Part I of the series [1] (see also *Quinkert's* amendment recorded in Footnote 17 of Part II [2]). There are four least strained idealized conformations (out of $2 \cdot 3^5$) per single strand mononucleotide unit, if phosphodiester conformations are restricted to the *sc/sc* type, and six more if that restriction is relaxed to allow also conformations of the *sc/ap* (but not *ap/ap*) type. In each ensemble there is just one conformationally repetitive case fulfilling the topological prerequisite for pairing within an oligomer. These two conformations are expected to resemble closely the types of conformations fixed in the respective duplexes. Since the path of reasoning in the conformational analysis of the homo-DNA single strand would also be valid, if applied to a DNA single strand with furanose rings held fixed in the C(3')-endo-(A-DNA-type) conformation, and since, in fact, the repetitive conformation of the *sc/sc* phosphodiester ensemble is observed – torsionally modified due to strain relaxation – in A-DNA oligonucleotide duplexes (see *Fig. 34* and Part I [1]), the result of the analysis is taken to indicate that *duplexation of single strands both in the DNA and the homo-DNA series is assisted by conformational preorganization*. Single-strand preorganization in the two series is, however, considered to differ in degree. Whereas the population of single-strand conformers available to the (idealized) homo-DNA model (per nucleotide unit) would be confined to four (or ten, depending on the phosphodiester restriction) variants, all with a single, rigid pyranose-chair conformation, the number of single-strand conformers available in the DNA series would be expected to be far less confined, because of the superposition of phosphodiester-bridge flexibility with the flexibility of the furanose ring.

sparte, aber nichtsdestoweniger angedeutete Möglichkeit einer sinngemäss mit dem enthalpischen Beitrag der Einzelstrang-Struktur einhergehenden strukturellen Präorganisation des Einzelstrangs auf die Duplex-Struktur hin entspräche der hier aus der Sicht der Homo-DNS-Bezugsstruktur konformationsanalytisch entwickelten Vorstellung.

Die im Vergleich zu Oligonucleotiden der DNS-Reihe nach allen bislang gemachten Beobachtungen generell tieferen (geringer negativen) ΔH -Werte der Duplexierung von Oligonucleotiden der Homo-DNS-Reihe dürfte vorab mit dem im *quasi*-linearen Homo-DNS-Einzelstrang-Modell zu hohen Basenabstand zusammenhängen. In vorläufiger Unkenntnis exakter Homo-DNS-Duplex-Strukturen muss dabei offen bleiben, wie das Manko an Duplexierungsenthalpie auf Basenstapelungs- und H-Verbrückung-Teilmankos oder auf konformationelle Spannung verteilt ist, die durch Rückgrat-Deformation und sterische Zucker-Basenpaar-Behinderung zustande kommt. Eine vermutlich relevante experimentelle Beobachtung hierzu ist die bei Homo-DNS-Duplexen generell geringere Hyperchromizität (vgl. *Tab. 1*), die insbesondere bei den (Purin-Purin)-Paarungen auffallend geringe Werte annimmt. Auf die an *quasi*-linearen Homo-DNS-Modellen leicht erkennbare Möglichkeit der sterischen Zucker-Basenpaar-Behinderung weist die deutliche Abschirmung der äquatorialen H-Atome an C(2') in den ¹H-NMR-Spektren (der Duplexe) von ddGlc(A₆), ddGlc((A-G)₃) hin (vgl. *Kap. 3.2.3*); darüber wird im Teil IV dieser Reihe [12] anhand des dort zu besprechenden Struktur-Bildes für den Duplex von ddGlc(A₅-T₃) im Detail eingegangen werden⁵²). Dort wird auch auf eine aus dem NMR-Strukturmodell des Duplexes sich andeutende Möglichkeit einer partiellen Strukturunordnung im Paarungsbezirk des Homo-DNS-Duplexes eingegangen, die mit einer teilweisen Interkalation von H₂O-Molekülen einhergehen und deshalb insbesondere auf den Entropie-Term der thermodynamischen Daten einen massgebenden Einfluss ausüben könnte. Letztlich würde auch ein solcher Einfluss die Konsequenz des für die Homo-DNS-Struktur kritischen Basenabstandes sein.

Aus den von uns durchgeführten Paarungsexperimenten lässt sich zur Frage einer anderweitigen Mitwirkung des Lösungsmittels für das Zustandekommen der Homo-DNS/DNS-Paarungsunterschiede nichts aussagen. Wohl dürfte die höhere thermodynamische Stabilität der Homo-DNS-Duplexe auch mit der im Vergleich zum 2'-Deoxyribose-Baustein (vermutlich) höheren Lipophilie des 2',3'-Dideoxypyranose-Bausteins zu tun haben; dass indessen ein solcher Lipophilie-Unterschied die Hauptursache des Stabilitätsunterschieds darstellen könnte, ist schon aus Beobachtungen über das Paarungsverhalten von hydroxylierten Hexopyranosyl-Oligonucleotiden auszuschliessen [35] [36] [54] [55].

An anderweitig in Frage kommenden Faktoren ist schliesslich der *Interstrang-Phosphat-Abstand* zu nennen, der in Homo-DNS-Duplexen als Folge der rein äquatorialen Positionierung der Basen am Pyranose-Sessel und vor allem bei (Purin-Purin)-gepaarten Duplexen generell grösser sein dürfte als in DNS-Duplexen. Während der Abstand der beiden (C(1'))-Basenverankerungs-Positionen eines *Watson-Crick*schen (Purin-Pyrimidin)-Basenpaares 11,3 Å beträgt, liegt der entsprechende Wert für ein *Watson-Crick*sches

⁵²) Aus später zu publizierenden Arbeiten über D- β -allopyranosyl-, D- β -2'-deoxyallopyranosyl-, D- β -3'-deoxyallopyranosyl-, D- β -altropyranosyl- und D- β -glucopyranosyl- (4'→6')-oligonucleotiden (vgl. [35] [36] [54] [13a] [55] [7]) wird hervorgehen, dass sterische Zucker-Basenpaar-Behinderungen bei den im Vergleich zu Homo-DNS stärker hydroxylierten Systemen eine zentrale Rolle spielt.

(Purin-Purin)-Basenpaar (z. B. Guanin-Isoguanin vgl. [13] [14] [3] und Teil V dieser Reihe) bei ca. 13,5 Å und für ein (Purin-Purin)-Basenpaar des 'reverse'-Hoogsteen-Typs um ca. 12 Å. Ein (vermutlich) stärker ins Gewicht fallender Unterschied dürfte darin liegen, das bei einem quasi-linearen Homo-DNS-Doppelstrang keine zusätzlichen Inter-Furchen-Phosphat-Wechselwirkungen vorkommen, wie dies bei DNS-Doppelsträngen des A- und B-Typs bezüglich der zugehörigen kleinen Furchen der Fall ist. Grösserer Interstrang-Phosphat-Abstand sollte – *ceteris paribus* – mit geringerer Interstrang-Ladungsabstossung einhergehen und damit zur höheren Stabilität der Homo-DNS-Duplexe beitragen. Der für den Duplex von ddGlc(A₆) beobachtete, gegenüber (Purin-Pyrimidin)-gepaarten DNS-Duplexen bedeutend flachere Anstieg der Schmelz-Temperatur mit steigender Salz-Konzentration könnte damit zusammenhängen. Hier anstehende, eingehendere Vergleichsuntersuchungen sind nicht angestellt worden.

Die (Purin-Purin)-Selbstpaarung von Adenin und Guanin ist aus konstitutioneller Sicht der wohl augenfälligste Unterschied im Paarungsverhalten von Homo-DNS- und DNS-Oligonucleotiden. Sie ist wohl auch der bedeutendste, denn die Tatsache, dass solche Selbstpaarungsaffinitäten in der DNS-Reihe zwar nicht ganz abwesend (vgl. unten), so doch stark in den Hintergrund gedrängt sind, stellt eine der anscheinend entscheidenden Voraussetzungen für das Funktionieren der Watson-Crick'schen Paarungsregeln in der Reihe der natürlichen Nucleinsäuren dar. Wegen des Phänomens der (Purin-Purin)-Paarung sind die in der Homo-DNS-Reihe bezüglich der vier (fünf) natürlichen Basen Guanin, Adenin, Cytosin und Thymin (Uracil) gültigen Paarungsprioritäten von den Watson-Crick'schen Paarungsregeln der DNS-Reihe verschieden. Fig. 35 resümiert die Unterschiede durch Gegenüberstellung experimentell unter vergleichbaren Bedingungen bestimmten Schmelz-Temperaturen einander entsprechender Hexanucleotide der Homo-DNS- und der DNS-Reihe. Diese Unterschiede decken einen wichtigen

Paarungsregeln:

	Homo-DNS		DNS
	G > A G > A C > A ~ G > T		G > A C > T

T_m-Werte von Hexameren [°]:

	Homo-DNS				DNS			
	A	T	G	C	A	T	G	C
Adenin	A	47			A	—		
Thymin	T	20	—		T	< 5	—	
Guanin	G	—	38		G	—	—	+
Cytosin	C	< 15	58	—	C	—	—	48

15–20 μM Nucleotid, 0,15M NaCl, 10 mM Tris pH 7

Fig. 35. Vergleich des Paarungsverhaltens von Homo-DNS- und DNS-Oligonucleotiden*)

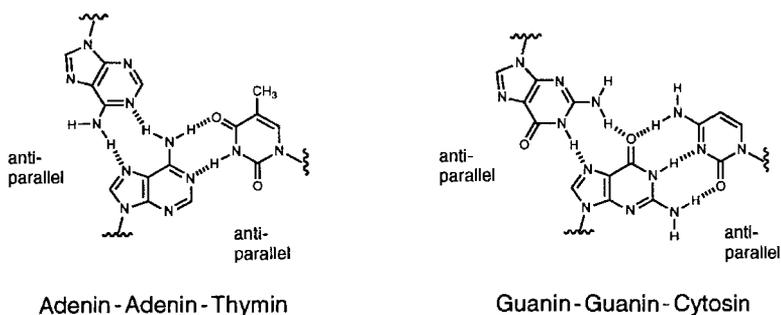
*) Summary of pairing capabilities of (short) oligonucleotides in the homo-DNA and DNA series. Numbers give melting temperatures (°C) determined under standard conditions (c ≈ 15–20 μM) of representative oligonucleotide hexamer duplexes [4] [5] [6] [7]. —: no pairing observed; +: d(G₆) pairing not comparable with ddGlc(G₆) pairing by melting temperatures; any A-G pairing in the ddGlc series probably would be obscured by homopurine pairing in the examples investigated.

Aspekt des Struktur-Typs der natürlichen Nucleinsäuren auf: *die Watson-Crick'schen Paarungsregeln sind nicht allein die Folge der konstitutionell bedingten chemischen Eigenschaften der Nucleinsäure-Basen, sondern ebenso sehr durch die spezifische Ring-Struktur des Zucker-Bausteins der DNS (und RNS) bedingt.*

Eine entscheidende, von der DNS erfüllte Voraussetzung der Eignung eines Struktur-Typs zur molekularen Informationsspeicherung ist die energetische *quasi*-Invarianz der *Basenpaarung* gegenüber der *Basenpaar-Sequenz*; d. h. der individuelle Beitrag der vier *Watson-Crick'schen* Basenpaare zur thermodynamischen Stabilität der DNS-Duplexe ist zwar nicht ganz [56] [57], aber doch *grosso modo* unabhängig von der Sequenz, mit welcher Basenpaare entlang der Duplex-Kette aufeinanderfolgen. Wie es die Gesamtheit unserer bisherigen Beobachtungen nahelegt (vgl. *Tab. 1* und *2*, *Schema 5*), trifft dies auch für die Homo-DNS zu⁵³). Nur deshalb ist übrigens die in *Fig. 35* gewählte Art der exemplifizierenden Gegenüberstellung der Paarungseigenschaften von Homo-DNS- und DNS-Oligonucleotiden aussagekräftig. Wünschbar wären hier natürlich nach Basenpaar-Typ faktorisierte und mit Nachbarschafts-Inkrementen versehene thermodynamische Daten, wie sie für DNS-Oligonucleotide verfügbar sind [57], zu welchen jedoch die erforderlichen systematischen Messungen (bislang) fehlen.

Die in *Kap. 3.2.* gemachte Feststellung, wonach die Selbstpaarungsaffinitäten von Adenin und Guanin des in der Homo-DNS-Reihe angetroffenen Typs in der DNS-Reihe nicht völlig fehlen, sondern im Hintergrund ebenfalls bestehen, bezieht sich auf Beobachtungen, die ab 1987 in der DNS-Literatur auftauchten [58], und sich seither ständig mehren [59] [42]. Es geht dabei um ein (Purin-Purin-Pyrimidin)-Tripelstrang-Motiv, das bei DNS-Duplexen mit einem Purin-Sequenz-Abschnitt unter günstigen Umständen dadurch zustande kommen kann, dass sich an letzterem ein entsprechender Purin-Sequenz-Abschnitt als dritter Strang anlagert, und zwar (nach gängiger Hypothese [59a, b, c]) dergestalt, dass sich Adenin mit Adenin und Guanin mit Guanin nach dem 'reverse'-*Hoogsteen*-Modus antiparallel paaren (*Schema 20*). Dieser Konstitutionsvor-

Schema 20. (Purin/Purin/Pyrimidin)-Paarung in DNS-Triplexen*)

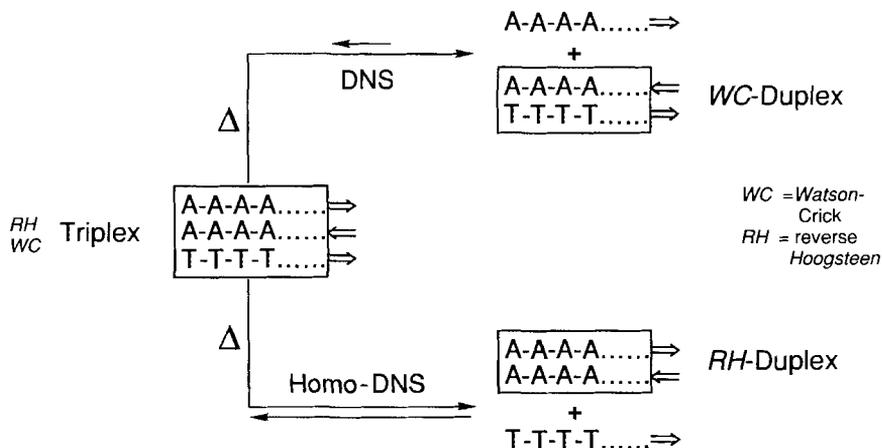


*) Purine-purine-pyrimidine triple strand motifs recently proposed to occur in DNA triplexes [58] [59] [42]. Purine-purine binding in these DNA triplexes is analogous to the purine-purine pairing in homo-DNA duplexes.

⁵³) Dass dies nicht etwa selbstverständlich ist, zeigen uns z. B. die Paarungseigenschaften von Allopyranosyl-oligonucleotiden, vgl. [35] [36] [7] und Teil (voraussichtlich) VI dieser Reihe.

schlag ist identisch mit dem Selbstpaarungsmodus der beiden Basen in der Homo-DNS-Reihe (vgl. *Schema 11* und *13*). Ein wesentlicher Unterschied liegt darin, dass in der DNS-Reihe solche ‘reverse’-*Hoogsteen*-(Purin-Purin)-Paarungen bislang ausschliesslich in Triplexen und nie in Duplexen beobachtet wurden, wie dies in der Homo-DNS-Reihe die Regel ist. Es dürfte sich hier indessen um Verhaltensmuster handeln, die nicht in qualitativer, sondern nur in quantitativer Hinsicht unterschiedlich sind, und die letztlich dem generellen Trend der (im Vergleich zur DNS-Reihe) stärkeren Homo-DNS-Basenpaarungen entsprechen. Ein (Duplex + Einzelstrang \rightleftharpoons Triplex)-Gleichgewicht sollte entropisch generell weniger auf die Seite der Komponenten gedrängt werden, als dies für ein entsprechendes Duplexierungs-Gleichgewicht der Fall ist, denn die Konformation der Doppelstrang-Komponente ist bereits voll auf die Triplex-Struktur hin präorganisiert, jedenfalls viel eher so, als dies für die Konformation der beiden Einzelstränge eines Duplexierungs-Gleichgewichts bezüglich der Duplex-Struktur zutreffen dürfte. Dieses Bild, wonach eine ‘reverse’-*Hoogsteen*-Selbstpaarung von Adenin mit Adenin und von Guanin mit Guanin in der DNS-Reihe spezifisch von der konformationellen Präorganisation des Duplex-Stranges profitiert, fügt sich qualitativ zwanglos in die Vorstellung ein, dass Homo-DNS-Einzelstränge einen höheren Paarungs-Präorganisationsgrad aufweisen als DNS-Einzelstränge (vgl. oben), und dass dies letztlich einer der Gründe dafür ist, dass die (Purin-Purin)-Selbstpaarung zu Duplexen zwar in der Homo-DNS-Reihe, jedoch (bislang) nicht in der DNS-Reihe beobachtet wurde. *Schema 21* fasst die aus bislang vorliegenden Befunden abgeleiteten unterschiedlichen Trends in der Lage von (Adenin-

Schema 21. Vermuteter Unterschied zwischen DNS und Homo-DNS im Dissoziationsverhalten von (Purin|Purin|Pyrimidin)-Triplexen*)



*) A systematic search for purine-purine-pyrimidine triplexes in the homo-DNA series has not yet been carried out. However, preliminary observations on triplex formation in the ddGlc(A_n)/ddGlc(T_n) series in the presence of MgCl₂ (see *Footnote 12*) suggests the hypothesis that the differing behavior of DNA and homo-DNA with respect to purine-purine pairing should be interpreted as difference of direction by which purine-purine-pyrimidine paired triplexes undergo the triplex \rightarrow duplex + single strand cleavage. The difference in degree of assistance by conformational preorganization in forming triplexes from duplexes and single strands vs. duplexes from two single strands seems relevant in this context.

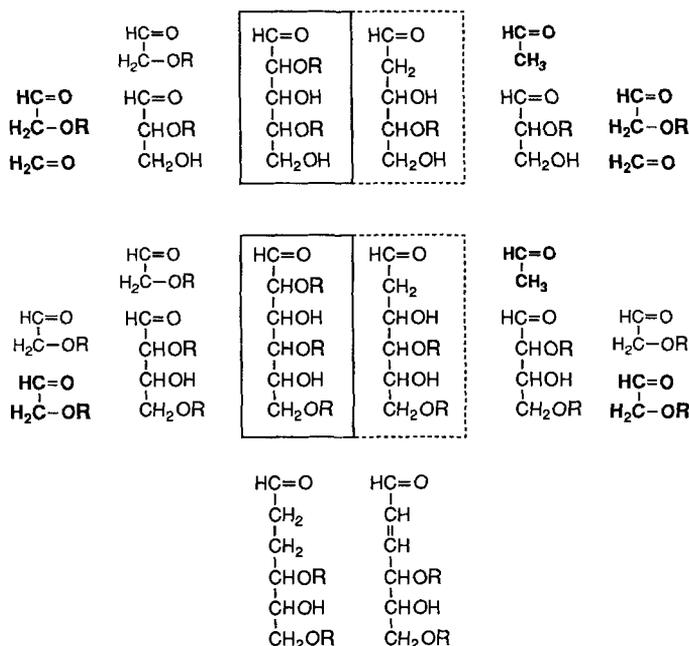
Adenin-Thymin)-Duplexierungs- und Triplexierungs-Gleichgewichten in der Homo-DNS- und DNS-Reihe zusammen. Dass das Triplexstrang-Motiv A-A-T auch in der Homo-DNS-Reihe heimisch sein dürfte, hat ein mit ddGlc(A₁₀) und ddGlc(T₁₀) durchgeführter Versuch angedeutet (vgl. *Fussnote 12*). Die hier notwendigen systematischen Untersuchungen zur Erfassung des Triplexierungspotentials von Homo-DNS-Oligonucleotiden sind bisher nicht angestellt worden.

6. Ausblick. – Die vorstehend beschriebene Untersuchung ist ein erster Schritt auf dem Wege zu einer experimentell begründeten Stellungnahme zur Frage, warum die Natur Pentosen und nicht Hexosen als Zucker-Bausteine ihrer Nucleinsäuren ausgewählt hat. Die experimentelle Behandlung dieser Fragestellung erfolgt im Grunde nach zwei grundsätzlich unterschiedlichen, indes zueinander komplementären Teilkonzepten. Im ersten dominiert der Aspekt der Funktion, der Eignung der Struktur zur Speicherung und Weitergabe molekularer Information. Hierbei zielt der Vergleich mit den Eigenschaften synthetischer Alternativ-Strukturen auf eine Hinterfragung der strukturellen Voraussetzungen des Funktionierens der natürlichen Nucleinsäuren und auf eine experimentelle Dokumentation der – so wird implizite unterstellt – funktionellen Optimiertheit ihres Struktur-Typs. Aus der Sicht dieses Teilkonzepts sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Chemie von Homo-DNS-Oligonucleotiden ein Beitrag, der keinem Vorbehalt begegnet.

Das zweite Teilkonzept fragt aus der Sicht chemischer Erfahrung nach den molekularen Struktur- und Reaktionskanälen, die der Natur auf ihrem Wege zur Selbstkonstituierung von replikations- und evolutionsfähigen molekularen Informations-Speichersystemen zur Verfügung gestanden haben mögen. Dieser Aspekt der Untersuchung ist – im wichtigen Gegensatz zum ersten – mit dem grundsätzlichen Vorbehalt über Fragestellungen belastet, welche die Rekonstruktion des Verlaufs zeitlich zurückliegender, natürlicher Ereignisse betreffen. Die experimentelle Aufgabe besteht hier darin, von den Erfahrungen der präbiotischen Chemie [60] ausgehend entlang Hinweisen von *retro*-Selbstkonstituierungs-Analysen funktionell in Frage kommender Oligonucleotid-Systeme die chemischen Voraussetzungen einer Selbstkonstituierung solcher Systeme zu prüfen. Die Auswahl der Alternativ-Strukturen, die man in Befolgung des ersten Teilkonzepts einem Funktionsvergleich mit den natürlichen Nucleinsäuren zu unterwerfen sich entschliesst, trifft man auf Grund von Ergebnissen und Vorstellungen, welche man nach den Richtlinien des zweiten Teilkonzepts gewinnt.

Im Sinne dieser Ausführungen kommt der bisherigen Arbeit über Homo-DNS-Oligonucleotide letztlich nur der Rang einer *Modelluntersuchung* zu. Der Zucker-Baustein der Homo-DNS ist aus derzeitiger chemischer Sicht nicht als potentiell präbiologischer Naturstoff zu betrachten. Er weist eine Struktur auf, die formal zwar einfacher, doch nach dem hier zuständigen Beurteilungs-Kriterium komplexer ist als die Struktur sämtlicher acht diastereomeren Hexosen der (CH₂O)₆-Familie [1]. Zuständig in diesem Zusammenhang ist das Kriterium der Selbstkonstituierbarkeit eines Struktur-Typs unter potentiell natürlichen, nicht-enzymatischen Bedingungen [60] [61]. *Schema 22* vermittelt die von uns benutzte Perspektive für eine solche Beurteilung, indem sie Stationen einer *retro*-Selbstkonstituierungs-Analyse der Konstitutionstypen der Hexosen (CH₂O)₆, Pen-

Schema 22. Retrosynthetische Beziehungen bei Aldopentosen und Aldohehexosen*)



*) Example of an assignment of relative molecular complexity to groups of sugar derivatives according to the criterion of a structure's potential for constitutional self-assembly. If one takes the aldolization chemistry of glycoaldehyde phosphate as a reference, then the list of derivatives of aldohexoses, aldopentoses, 2-deoxy-aldohexoses, 2-deoxy-aldopentoses, and 2,3-dideoxy-aldohexoses orders these groups of sugars in a sequence of increasing molecular complexity. 2,3-Dideoxy-aldohexose derivatives should not be considered to have been available as prebiological starting materials.

tosen (CH₂O)₅ und von 2,3-Dideoxy-hexopyranosen einander gegenüberstellt⁵⁴). In die Betrachtung miteinbezogen ist der Zucker-Baustein der natürlichen DNS, die 2-Deoxyribose, die gegenüber Ribose deshalb eine komplexere Struktur besitzt, weil sie entweder Acetaldehyd als zusätzlichen Baustein, oder dann eine reduktive Elimination der zur Carbonyl-Funktion α-ständigen OH-Gruppe der Ribose voraussetzt⁵⁵). Analoges würde auch für den Struktur-Typ einer 2,3-Dideoxyhexopyranose zutreffen; darüber hinaus aber ist dieser Zucker-Typ vor allem auch noch deshalb der im Vergleich zu sämtlichen Aldo-Zuckern der Formose-Familie komplexere, weil seine Konstituierung nach beiden Varianten zusätzlich eine H₂O-Elimination und nochmalige Änderung des Oxidationszustandes erfordert. Was aus solcher Sicht für die Struktur-Typen der Aldohehexosen

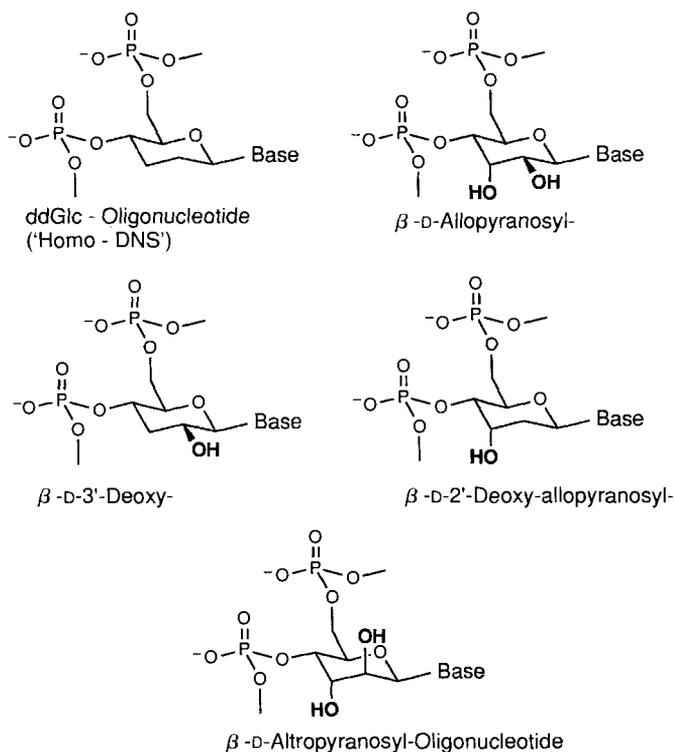
⁵⁴) Die hier implizierte Variante der Formose-Reaktion (vgl. z. B. [60]) ist die von Glykoaldehyd-phosphat ausgehende und einheitlich zu Aldohehexose- bzw. Aldopentose-phosphaten führende Reaktionsfolge [62].

⁵⁵) Aus chemischer Sicht erscheint ein solcher biomimetischer Übergang des Struktur-Typs der Ribose in jenen der 2-Deoxyribose als durchaus möglich, bemerkenswerterweise ganz im Gegensatz zu einem entsprechenden Übergang in den Struktur-Typ der 3-Deoxyribose.

$(\text{CH}_2\text{O})_6$ und Aldopentosen $(\text{CH}_2\text{O})_5$ in Betracht gezogen werden darf, dass nämlich diese beiden Stoff-Gruppen mit vergleichbarer Wahrscheinlichkeit vorbiologisch verfügbar gewesen sein mögen, gilt nicht für den Zuckerbaustein der Homo-DNS.

Die im Titel der Untersuchungsreihe zum Ausdruck kommende Zielsetzung würde eigentlich die Synthese und experimentelle Überprüfung der Paarungseigenschaften von allen möglichen Oligonucleotid-Systemen mit $(\text{CH}_2\text{O})_6$ -Hexosen als Zucker-Bausteinen verlangen. Dabei wird man sich sinnvollerweise an eine Prioritätenfolge halten, die sich sowohl bezüglich des Oligonucleotid-Konstitutionstyps als auch der (relativen) Konfiguration der Hexose auf eine vergleichende konformationsanalytische Abschätzung des Paarungspotentials stützt. Darüber hinaus liegt es nahe, das Kriterium der Selbstkonstituierbarkeit konfigurationsdifferenzierend auf die Familie der acht diastereomeren Hexosen anzuwenden. Hierzu wissen wir aus eigenen experimentellen Untersuchungen über die Aldolisierung von Glykolaldehyd-phosphat, dass in solchen Aldolisierungsgemischen

Schema 23. Richtung der Fortsetzung der Untersuchung über Hexopyranosyl-Oligonucleotide*)



*) The *Scheme* gives the formulae of the hexopyranosyl-(4'→6')-oligonucleotide systems which became the objects of investigation in the wake of the homo-DNA-model study. As a consequence of the observations made in the glycoaldehyde phosphate aldolization study [62], the allose system was chosen first [35] [36] its pairing properties engendered a comparative study of the 2'-deoxy- and the 3'-deoxyderivatives [54], the outcome of which in turn led to an investigation of the altropyranosyl system. The results of these studies will be the subject of part VI of this series.

unter Bedingungen kinetischer Kontrolle das Allose-Derivat vorherrscht, dass an zweiter Stelle das Altrose-Derivat steht und dass schliesslich bei Langzeit-Äquilibrium das (Allose/Altrose)-Verhältnis sich zugunsten des letzteren verschiebt [62] [63]. Dementsprechend haben wir im Anschluss an die Homo-DNS-Studie das D-Allopyranosyl-(4'→6')-oligonucleotid-System bearbeitet [35] [36] [7], haben dann als Reaktion auf die dabei festgestellten Paarungseigenschaften das D-2'-Deoxy- sowie das D-3'-Deoxy-allopyranosyl-Modellsystem überprüft [54] und sind hieraus schliesslich zur experimentellen Bearbeitung des D-Altropyranosyl-(4'→6')-oligonucleotid-Systems gelangt [55] (vgl. *Schema 23*). Die Beschreibung der Ergebnisse dieser Untersuchungen ist für den Teil VI dieser Reihe vorgesehen.

Die Arbeit wurde unterstützt vom *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* sowie von der *Ciba-Geigy AG*, Basel, und der *Firmenich SA*, Genf. *M. G.* dankt für ein Postdoktorats-Stipendium des *Forschungsfonds der Deutschen Chemischen Industrie*. Zu grossem Dank verpflichtet sind wir Herrn Dr. *H. Widmer* (Sandoz, Basel), der für uns in seinem Laboratorium eine der Untersuchungen mit zweidimensionaler NMR-Spektroskopie durchgeführt hat. Prof. Dr. *P. L. Luisi* (ETH) danken wir für seine freundliche Erlaubnis, in seinem Laboratorium die CD-Spektren aufnehmen zu dürfen. Schliesslich danken wir Herrn Dr. *F. Kreppelt* (ETH) für die Erstellung zahlreicher Abbildungen für diese Arbeit und Prof. Dr. *C. Wintner* (Haverford College, USA) für seine Mitwirkung bei der Abfassung der *English summaries*.

Experimenteller Teil

Material und Methoden. a) *Herstellung der Oligonucleotide.* Die Synthese, chromatographische Reinigung und Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Oligo-homo-deoxyribonucleotide sind in [2] beschrieben. Zu Vergleichszwecken verwendete, natürliche Oligo-deoxyribonucleotide wurden auf einer DNS-Synthesemaschine (*Applied Biosystems Inc.*, Mod. 380B) im 1- μ mol-Massstab nach den Standardangaben des Herstellers [64] mit 2-Cyanoethyl-phosphoramiditen als Synthese-Bausteinen hergestellt. (Reagenzien und Phosphoramidite der *Applied Biosystems Inc.*). Die Reinigung dieser Oligomere erfolgte analog, wie für Oligo-homodeoxyribonucleotide in [2] beschrieben, mittels HPLC.

b) *Bestimmung der Konzentration von Oligonucleotiden in Lösung.* Oligo-homo-deoxyribonucleotid-Konzentrationen wurden in gepufferter, neutraler Lsg. (pH 7,0) mittels UV-Spektroskopie bei 260 nm im linearen, praktisch temperatur-unabhängigen Absorptionsbereich bestimmt, bei selbstkomplementären oder partiell selbstkomplementären Sequenzen oberhalb der Schmelz-Temp. Der Extinktionskoeffizient des Oligomeres wurde dabei als Summe der Extinktionskoeffizienten aller vorkommenden Mononucleosid-Einheiten errechnet, für welche bei 260 nm die folgenden, an den reinen Mononucleosiden experimentell ermittelten ϵ -Werte verwendet wurden: ddGlc(U) 10200, ddGlc(T) 9500, ddGlc(C) 7800, ddGlc(G) 11100, ddGlc(A) 14700, ddGlc(c⁷A) 8900. Die Extinktionskoeffizienten von natürlichen Oligo-deoxyribonucleotiden wurden wie in [65] beschrieben abgeschätzt.

c) *UV-Schmelz-Kurven.* UV-Absorptions- vs. Temp.-Diagramme wurden auf einem *Perkin-Elmer Lambda 2* Spektrophotometer, ausgerüstet mit einem thermoelektrischen Küvettenhalter und einem *Perkin-Elmer Temperature Programmer C570-0710*, aufgezeichnet. In der Anfangsphase der Untersuchungen wurde jeweils die Mess-Temp. manuell in 3–5°-Schritten variiert und nach Absorptionskonstanz jeweils die (Temp./Absorption)-Wertepaare registriert. Temperaturen wurden am Thermoblock in unmittelbarer Küvettennähe gemessen. Später wurde die Ausrüstung sukzessive mit einem *Perkin-Elmer Digital Controller 570-071* ergänzt und das Spektrophotometer mittels einem *Compaq Deskpro 286e*-Computer und *Perkin-Elmer PECS-Software (Vers. 4.0)* gesteuert, wobei nun die Temp. mittels eines Thermoelementes direkt in der Mess-Lsg. erfasst wurde. Probelösungen wurden so linear und, sofern nicht anders vermerkt, mit einer Geschwindigkeit von 0.5–1°/min aufgeheizt resp. abgekühlt. (Temp./Absorption)-Wertepaare wurden im Abstand von 30–60 s. aufgezeichnet. Um die Bildung von Kondenswasser bei tiefen Temperaturen zu verhindern, wurde der Probenraum kontinuierlich mit N₂ gespült. Mess-Lösungen wurden, zur Verhinderung von Blasenbildung, vorgängig während ca. 3–5 min bei 40 Torr entgast. Schmelz-Kurven sind in relativer Hyper- (bzw. Hypo-)chromie (in %) vs. Temp. (in °C) ausgedrückt; die prozentuale Hyperchromie (H) wurde dabei nach der Formel $H = ((A(T) - A^\circ)/A^\circ) \times 100$ berechnet, wobei $A(T)$ die Absorption bei der Temp. T und A° die tiefste gemessene Absorption repräsentiert (zur Definition von Hyper- (bzw. Hypo-)chromie vgl. z. B. [9b]). T_m -Werte und thermodynamische Daten von (Duplex \rightleftharpoons Einzelstrang)-Übergängen

wurden nach den in [11] beschriebenen Methoden bestimmt (gegebenenfalls ohne Substraktion der Basislinien). *Van't Hoff'sche* Paarungsenthalpien (ΔH) und -Entropien (ΔS) wurden aus der linearen Beziehung der reziproken T_m -Werte zum Logarithmus der Oligonucleotid-Konzentration nach den Formeln $1/T_m = (R/\Delta H) \ln c + \Delta S/\Delta H$ (bimolekulare Assoziation zweier selbstkomplementärer Sequenzen) und $1/T_m = (R/\Delta H) \ln c + (\Delta S - R \ln 4)/\Delta H$ (bimolekulare Assoziation zweier nicht-selbstkomplementärer Sequenzen) errechnet [11a], wobei c die Oligonucleotid-Gesamtkonz. und R die Gaskonstante bedeuten. Einen Anhaltspunkt über den Fehlerbereich dieser Daten ergibt sich aus den R -Faktoren der linearen Regression der ($1/T_m$ vs. $\ln c$)-Darstellungen, die in den entsprechenden *Figuren* jeweils angegeben sind.

d) *Paarungstöchiometrien* wurden in Anlehnung an beschriebene Methoden [66] durch Messung der UV-Absorption bei 260 (oder 280 nm) von Misch-Lösungen zweier Oligonucleotid-Lösungen von je zwischen 0→100% variierender Zusammensetzung und konstanter Oligonucleotid-Gesamtkonz. bestimmt.

e) *CD-Spektroskopie*. CD-Spektren wurden auf einem *Jasco-J-600* Spektropolarimeter mit einem *IBM-AT*-Personal Computer als Steuereinheit und einem *HP-7475A*-Plotter als Ausgabegerät aufgezeichnet. Messungen wurden in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke im Wellenlängen-Bereich von 210–320 nm durchgeführt. Die Temp. der Messzelle wurde mittels eines thermostatisierbaren Wärmebades variiert, wobei die exakte Proben-Temp. mit einem Thermoelement direkt in der Mess-Lsg. bestimmt wurde. Angabe der Messdaten in mdeg.

f) *Gel-Elektrophorese*. Apparatur: *Bethesda Research Laboratories*, Mod. S2 (Sequencing gel) mit *BioRad Power Supply* Mod. 3000/300. 20% Polyacrylamid-Gele (Acrylamid/Bisacrylamid 30:1) der Dimension $365 \times 306 \times 0,8$ mm hergestellt nach [67]. Sofern nicht anders vermerkt, wurde als Puffer 0,1M Tris, 0,1M Borsäure 5 mm $MgCl_2$, (pH 8,3) verwendet und die Elektrophorese anschliessend bei einer konstanten Leistung von 10 W während 16 h bei RT. durchgeführt. Zum Auftragen der Proben wurde jeweils eine 10% Saccharose-Lsg. im Elektrophoresepuffer verwendet, als Referenz diente Bromphenolblau. Sichtbarmachung der Oligonucleotide nach der Elektrophorese erfolgte durch Einfärbung des Gels mit einer Lsg. von 100 mg 'stains all' (*Fluka*, Nr. 85663) in 800 ml $H_2O/HCONH_2$ 1:1 (vgl. [68]).

g) *¹H-NMR-Spektroskopie*. NMR-Proben (ddGlc(A₆): 10 mM, 0,1M NaCl, 0,05M Na₂PO₄, 0,1% w/v NaN₃, mit H₃PO₄ auf pH 7; ddGlc((A-G)₃): 8,7 mM, 0,1M Na₂HPO₄, 0,1% w/v NaN₃, mit H₃PO₄ auf pH 7; ddGlc(A₄-H₄): 5 mM, 0,1M Na₂HPO₄, 0,1% w/v NaN₃, mit H₃PO₄ auf pH 7) wurden zweimal in D₂O gelöst und lyophilisiert, dann in D₂O (99,98% D) gelöst und in ein 5-mm-NMR-Röhrchen filtriert. Die Mess-Temp. betrug 27° und wurde geregelt.

1D-Spektren: ¹H-NMR (500 MHz für ddGlc(A₆), 400 MHz für ddGlc((A-G)₃) und ddGlc(A₄-H₄), extern referenziert auf DSS in D₂O).

³¹P-NMR (161,98 MHz): {¹H}-breitbandenkoppelte (WALTZ 16) Spektren, extern referenziert auf 85% H₃PO₄.

2D-Spektren: Ausser für (¹H, ³¹P)-COSY Spektren, wurde das Signal HDO durch Vorsättigung unterdrückt. Aufgeführt sind die Mess-Parameter für ddGlc((A-G)₃), ddGlc(A₄-H₄) und ddGlc(A₆) wurden unter analogen, in einzelnen Parametern leicht abweichenden Bedingungen gemessen. 1) (¹H, ¹H)-2QF-COSY [69]: phasensensitiv; TPPI. Aquisition: 4K × 512 Datenpunkte, je 4000-Hz-Spektralbreite in ω_2 und ω_1 , 32 scans/FID. Transformation in 2K × 1K (*rr*) nach Gewichtung mit $\sin^2(\theta + \pi/4)$ in ω_2 und $\sin^2(\theta + \pi/3)$ in $\omega_1 \cdot 2$ (¹H, ³¹P)-COSY: ¹H-detektiert [70], phasensensitiv, TPPI. Aquisition: 4K × 512 Datenpunkte, Spektralbreite 4000 Hz in ω_2 und 1000 Hz in ω_1 , 32 scans/FID. Transformation in 2K × 1K (*rr*) nach Gewichtung mit $\sin^2(\theta + \pi/4)$ in ω_2 und $\sin^2(\theta + \pi/3)$ in $\omega_1 \cdot 3$ (¹H, ¹H)-TOCSY [71]: phasensensitiv, TPPI, 80 ms MLEV17-Mischung ($\gamma/2\pi = 10$ kHz); Aquisition: 4K × 512 Datenpunkte; 4000-Hz-Spektralbreite in ω_2 und ω_1 ; 16 scans/FID. Transformation in 2K × 1K (*rr*) nach Gewichtung mit $\sin^2(\theta + \pi/3)$ in ω_2 und $\sin^2(\theta + \pi/2)$ in $\omega_1 \cdot 4$ (¹H, ¹H)-NOESY [72]: phasensensitiv, TPPI, 2 Aufnahmen mit Mischzeiten von 50 und 150 ms, zufallsvariiert um ±5% (150 ms) resp. ±15% (50 ms). Aquisition: 4K × 512 Datenpunkte; Spektralbreite 4000 Hz in ω_2 und ω_1 , 112 scans/FID. Transformation in 2K × 1K (*rr*) nach Gewichtung mit $\sin^2(\theta + \pi/3)$ in ω_2 und $\sin^2(\theta + \pi/2)$ in ω_1 . Baselinekorrektur in ω_2 mit Polynom 3. Grades.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A. Eschenmoser, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta*, **1992**, 75, 218.
- [2] M. Böhringer, H.-J. Roth, J. Hunziker, M. Göbel, R. Krishnan, A. Giger, B. Schweizer, J. Schreiber, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta*, **1992**, 75, 1416.
- [3] A. Eschenmoser, *Nova Acta Leopoldina* **1992**, Bd. 67, Nr. 281, S. 201; A. Eschenmoser, E. Loewenthal, *Chem. Soc. Rev.* **1992**, 21, 1 (englische Fassung).

- [4] H.-J. Roth, 'Homo-DNA: Herstellung, Paarungseigenschaften und Struktur von Adenin-/Thymin-haltigen Oligonukleotiden'. Diss. Nr. 9591, ETH-Zürich, 1991.
- [5] M. Böhringer, 'Synthese und strukturelle Charakterisierung von Adenin-Oligonukleotiden mit 2,3-Dideoxy-D- und L-glucopyranosen als Zuckereinheiten'. Diss. Nr. 9377, ETH-Zürich, 1991.
- [6] J. Hunziker, 'Homo-DNA: Herstellung und Paarungseigenschaften von Guanin-haltigen Oligonukleotide', Diss. Nr. 9814, ETH-Zürich, 1992.
- [7] A. Giger, 'Untersuchungen über Oligonucleotide mit 2-Deoxy-D-ribose, 2,3-Dideoxy-D-glucopyranose und D-Allopyranose als Zuckerbausteine', Diss. Nr. 9975, ETH-Zürich, 1992.
- [8] U. Diederichsen, 'A. Hypoxanthin-Basenpaarungen in Homo-DNA-Oligonukleotiden. – B. Zur Frage des Paarungsverhaltens von Glucopyranosyl-Oligonukleotiden'. Diss., ETH-Zürich, 1993 (in Vorbereitung).
- [9] a) C. R. Cantor, P. R. Schimmel, 'Biophysical Chemistry' Part III, 1980, Chap. 22 und 23, W. H. Freeman & Co. San Francisco; b) *ibid.* II, Chap. 7–4, p. 385ff.
- [10] W. D. Wilson, M.-H. Dotrong, E. T. Zuo, G. Zon, *Nucleic Acid Res.* **1988**, *16*, 5137.
- [11] a) L. A. Marky, K. J. Breslauer, *Biopolymers*, **1987**, *26*, 1601; b) K. J. Breslauer in H.-J. Hinz (Ed.), 'Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology', Springer-Verlag, 1986, p. 402ff; c) D. De Prisco Albergo, L. A. Marky, K. J. Breslauer, D. H. Turner, *Biochemistry* **1981**, *20*, 1409.
- [12] H.-J. Roth, C. Leumann, A. Eschenmoser, G. Otting, M. Billeter, K. Wüthrich, *Helv. Chim. Acta*, in Vorbereitung.
- [13] a) Katrin Groebke, 'Über Purin-Purin-Paarungen bei Hexopyranosyl-Oligonukleotiden'. Diss., ETH-Zürich, 1993 (in Vorbereitung); b) Ling Peng, '1. Synthese und Eigenschaften von Oligo-1',2'-seco-2'-deoxy-D-ribonukleotiden. 2. Über Purin-Purin-gepaarte Oligonukleotide der Homo-DNA-Reihe'. Diss., ETH-Zürich, 1992 (in Vorbereitung).
- [14] K. Groebke, W. Fraser, J. Hunziker, Ling Peng, A. Giger, U. Diederichsen, K. Zimmermann, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta*, in Vorbereitung.
- [15] W. Saenger, 'Principles of Nucleic Acid Structure', Springer-Verlag New York Inc., 1984.
- [16] J. Brahm, A. M. Michelson, K. E. Van Holde, *J. Mol. Biol.* **1966**, *15*, 467.
- [17] A. Rich, D. R. Davies, F. H. C. Crick, J. D. Watson, *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 71.
- [18] D. Suck, P. C. Manor, W. Saenger, *Acta Crystallogr., Sect. B* **1976**, *32*, 1727.
- [19] P. Doty, H. Boedtker, J. R. Fresco, R. Haselkorn, M. Litt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1959**, *45*, 482.
- [20] G. S. Manning, *Quart. Revs. Biophys.* **1978**, *11*, 179.
- [21] C. Schildkraut, S. Lifson, *Biopolymers* **1965**, *3*, 195.
- [22] D. S. Pilch, C. Levenson, R. H. Shafer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 1942.
- [23] G. E. Plum, Y.-W. Park, S. F. Singleton, P. B. Dervan, K. J. Breslauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 9436.
- [24] M. Senior, R. A. Jones, K. J. Breslauer, *Biochemistry* **1988**, *27*, 3879.
- [25] C. H. Kang, X. Zhang, R. Ratliff, R. Moyzis, A. Rich, *Nature* **1992**, *356*, 126; F. W. Smith, J. Feigon, *Nature* **1992**, *356*, 164.
- [26] R. Lohrmann, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1980**, *142*, 555.
- [27] M. Knop, Diplomarbeit ETH Zürich, Wintersemester 1990/91.
- [28] J. H. van de Sande, N. B. Ramsing, M. W. Germann, W. Elhorst, B. W. Kalisch, E. V. Kitzing, R. T. Pon, R. C. Clegg, T. M. Jovin, *Science* **1988**, *241*, 551; M. W. German, B. W. Kalisch, J. H. van de Sande, *Biochemistry* **1988**, *27*, 8302; N. B. Ramsing, T. M. Jovin, *Nucl. Acids Res.* **1988**, *16*, 6659.
- [29] R. Jin, K. J. Breslauer, R. A. Jones, B. L. Gaffney, *Science* **1990**, *250*, 543.
- [30] J. M. Sturtevant, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1987**, *38*, 463.
- [31] M. Tarköy, C. Leumann, *Helv. Chim. Acta*, in Vorbereitung.
- [32] K. Wüthrich, 'NMR of Proteins and Nucleic Acids', J. Wiley & Sons New York, 1986.
- [33] Z. Kazimierczuk, H. B. Cottam, G. R. Revankar, R. K. Robins, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6379; F. Seela, H.-P. Mutz, U. Bindig, *Synthesis* **1988**, 670.
- [34] H. Moser, P. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 645; und dort citierte frühere Lit.
- [35] R. Fischer, 'Allopyranosyl-Nukleinsäure: Synthese, Paarungseigenschaften und Struktur von Adenin-/Uracil-enthaltenden Oligonukleotiden'. Diss. Nr. 9971, ETH-Zürich, 1992.
- [36] A. Helg, 'Allopyranosyl-Nukleinsäure: Synthese, Paarungseigenschaften und Struktur von Guanin-/Cytosin-enthaltenden Oligonukleotiden'. Diss., ETH-Zürich, 1993 (in Vorbereitung).
- [37] W. N. Hunter, T. Brown, N. N. Anand, O. Kennard, *Nature* **1986**, *320*, 552; T. Brown, G. A. Leonard, E. D. Booth, G. Kneale, *J. Mol. Biol.* **1990**, *212*, 437; C. Wang, H. Gao, B. L. Gaffney, R. A. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5486.

- [38] J. Donohue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1956**, *42*, 60.
- [39] P. Hobza, C. Sandorfy, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1302.
- [40] a) R. F. Steiner, R. F. Beers, Jr., *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, *32*, 166. b) D. B. Lerner, D. R. Kearns, *Biopolymers* **1981**, *20*, 803.
- [41] A. Rich, *Biochim. Biophys. Acta* 1958, *29*, 502; M. Gellert, M. N. Lipsett, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1962**, *48*, 2013; S. Arnott, R. Chandrasekaran, C. M. Marttila, *Biochem. J.* **1974**, *141*, 537; S. B. Zimmerman, G. H. Cohen, D. R. Davies, *J. Mol. Biol.* **1975**, *92*, 181.
- [42] P. A. Beal, P. B. Dervan, *Nucleic Acid Res.* **1992**, *20*, 2773 und daselbst zitierte Lit.
- [43] R. V. Wolfenden, *J. Mol. Biol.* **1969**, *40*, 307.
- [44] R. D. Brown, P. D. Godfrey, D. McNaughton, A. P. Pierlot, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *156*, 61.
- [45] U. Norinder, *J. Mol. Struct.* **1987**, *151*, 259.
- [46] D. J. Patel, S. A. Koslowski, A. Nordheim, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1982**, *79*, 1413; A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1985**, *17*, 1; B. Celda, H. Widmer, W. Leupin, W. J. Chazin, W. A. Denny, K. Wüthrich, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1462.
- [47] P. P. Lankhorst, C. A. G. Haasnoot, C. Erkelens, C. Altona, *J. Biomol. Struct. Dynamics* **1984**, *1*, 1387.
- [48] a) V. Prelog, *Science* **1976**, *193*, 17; b) C. E. Wintner, *J. Chem. Educ.* **1983**, *60*, 550.
- [49] A. Rich, A. Nordheim, A. H.-J. Wang, *Ann. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 791.
- [50] a) C. Altona, M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8205; b) M. Levitt, A. Warshel, *ibid.* **1978**, *100*, 2607; c) E. Westhof, M. Sundaralingam, *ibid.* **1980**, *102*, 1493; *ibid.* **1983**, *105*, 970; W. K. Olson, *ibid.* **1982**, *104*, 278; S. C. Harvey, M. Prabhakaran, *ibid.* **1986**, *108*, 6128; d) H. P. M. de Leeuw, C. A. G. Haasnoot, C. Altona, *Israel J. Chem.* **1980**, *20*, 108.
- [51] M. Sundaralingam, *Biopolymers* **1969**, *7*, 821; S. Arnott, D. W. L. Hukins, *Nature (London)* **1969**, *224*, 886; S. Arnott, *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **1970**, *21*, 267; N. Yathindra, M. Sundaralingam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1974**, *71*, 3325.
- [52] D. G. Gorenstein, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1047; D. G. Gorenstein, J. B. Findlay, B. A. Luxon, D. Kar, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3473; V. A. Roongta, C. R. Jones, D. G. Gorenstein, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5245.
- [53] G. Vesnaver, K. J. Breslauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 3569.
- [54] R. Hammer, Postdoktorat ETH-Zürich 1991–92, unveröffentlichte Arbeiten über D-β-2'- und 3'-Deoxyallopyranosyl-oligonucleotide.
- [55] K. Groebke, P. Adam, R. Krishnamurthy, unveröffentlichte Arbeiten über D-β-Altropranosyl-oligonucleotide, ETH-Zürich 1992.
- [56] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737.
- [57] K. J. Breslauer, R. Frank, H. Blöcker, L. A. Marky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 3746.
- [58] S. L. Broitman, D. D. Im, J. R. Fresco, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 5120; A. G. Letai, M. A. Palladino, E. Fromm, V. Rizzo, J. R. Fresco, *Biochemistry* **1988**, *27*, 9108; M. Cooney, G. Czernuszewicz, E. H. Postel, S. J. Flint, M. E. Hogan, *Science* **1988**, *241*, 456.
- [59] P. A. Beal, P. B. Dervan, *Science* **1991**, *251*, 1360; b) D. S. Pilch, C. Levenson, R. H. Shafer, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6081; c) I. Radhakrishnan, C. de los Santos, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.* **1991**, *221*, 1403; d) J. Klysik, K. Rippe, T. M. Jovin, *Nucl. Acid. Res.* **1991**, *19*, 7145.
- [60] S. L. Miller, L. E. Orgel, 'The Origins of Life on the Earth', Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., U.S.A., 1974.
- [61] A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 5; *ibid. Int. Ed.* **1988**, *27*, 5.
- [62] D. Müller, S. Pitsch, A. Kittaka, E. Wagner, C. E. Wintner, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 1410.
- [63] S. Pitsch, 'Zur Chemie von Glykolaldehydphosphat'. Diss., ETH-Zürich, 1992 (in Vorbereitung).
- [64] Applied Biosystems, 'User Manual' Mod. 380B Vers. 1.34.
- [65] Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd Ed.; Nucleic Acids, Vol. I; G. D. Fasman (Ed.), CRC-Press, Cleveland (Ohio), 1975, p. 589.
- [66] P. Job, *Ann. Chim.*, 10e série **1928**, *9*, 113.
- [67] T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, 'Molecular Cloning, a Laboratory Manual', Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 173ff.
- [68] Applied Biosystems User Bulletin, No. 13 (Revised), 1987.
- [69] M. Rance, O. W. Sørensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983** (177), 479–485.
- [70] A. A. Mundsley, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **1977**, *50*, 368.
- [71] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985** (65), 355–360.
- [72] S. Macura, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* **1980**, *41*, 95–117.