

## 196. Warum Pentose- und nicht Hexose-Nucleinsäuren?

Teil IV<sup>1)</sup>

### ‘Homo-DNS’: <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, <sup>31</sup>P- und <sup>15</sup>N-NMR-spektroskopische Untersuchung von ddGlc(A-A-A-A-T-T-T-T) in wässriger Lösung

von Gottfried Otting<sup>2)</sup>, Martin Billeter und Kurt Wüthrich\*

Institut für Molekularbiologie und Biophysik der Eidgenössischen Technischen Hochschule-Hönggerberg,  
CH-8093 Zürich

und Hans-Jörg Roth<sup>3)</sup>, Christian Leumann und Albert Eschenmoser\*

Laboratorium für Organische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Universitätstrasse 16,  
CH-8092 Zürich

Dulio Arigoni zu seinem 65. Geburtstag gewidmet

(21. X. 93)

### Why Pentose- and Not Hexose-Nucleid Acids? Part IV<sup>1)</sup>.

#### ‘Homo-DNA’: <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, <sup>31</sup>P-, and <sup>15</sup>N-NMR-Spectroscopic Investigation of ddGlc(A-A-A-A-T-T-T-T) in Aqueous Solution

From a comprehensive NMR structure analysis, it is concluded that the ‘homo-DNA’ oligonucleotide ddGlc(A-A-A-A-T-T-T-T) in 3 mM D<sub>2</sub>O solution (100 mM NaCl, 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, *T* = 50°) forms a duplex of C<sub>2</sub>-symmetry, with its self-complementary oligonucleotide strands in antiparallel orientation. The 2',3'-dideoxy-β-D-glucopyranosyl rings are in their most stable chair conformation, with all three substituents equatorial and with the adenine as well as the thymine bases in the *anti*-conformation. The base pairing is of the *Watson-Crick* type; this pairing mode (as opposed to the reverse-*Hoogsteen* mode) was deduced from the observation of *interstrand* NOEs between the adenine protons H-C(2) and the pyranose protons H<sub>2</sub>-C(2') of the sequentially succeeding thymidine nucleotides of the opposite strand, a correlation which discriminates between the *Watson-Crick* and the reverse-*Hoogsteen* pairing mode. The NOEs of the NH protons with either the adenine protons H-C(2) or H-C(8), that are normally used to identify the pairing mode in DNA duplexes, cannot be observed here, because the NH signals are very broad. This line broadening is primarily due to the fact that the exchange of the imino protons with the solvent is faster than for corresponding DNA duplexes.

Computer-assisted modeling of the [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)]<sub>2</sub> duplex with the program CONFOR [23], using the linear (idealized) homo-DNA single-strand conformation ( $\alpha = -60^\circ$ ,  $\beta = 180^\circ$ ,  $\gamma = 60^\circ$ ,  $\delta = 60^\circ$ ,  $\epsilon = 180^\circ$ ,  $\zeta = -60^\circ$ , see [1] [3]) as the starting structure, resulted in two duplex models A and B (see *Figs. 27–32*, *Scheme 9*, and *Table 4*) which both contain *quasi*-linear double strands with the base-pairing axis inclined relative to the strand axes by *ca.* 60° and 45°, respectively, and with base-pair stacking distances of *ca.* 4.5 Å. While neither of the two models, taken

<sup>1)</sup> Teile I–III der Reihe ‘Warum Pentose- und nicht Hexose-Nucleinsäuren?’, vgl. [1–3]. Die Arbeit gilt zugleich als 8. Mitt. in der Reihe ‘Chemie von α-Aminonitrilen’. Ein Teil der hier publizierten Ergebnisse wurde von *H.-J. R.* an der Herbstversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Bern am 16.10.1991 vorgetragen. Teil-Ergebnisse der Arbeit sind auch in gedruckten erschienenen Vorträgen erwähnt worden, vgl. [4] [5].

<sup>2)</sup> Derzeitige Adresse: Institute of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, S-17177 Stockholm.

<sup>3)</sup> Vgl. Promotionsarbeit [6]; derzeitige Adresse: *Sandoz AG*, Basel.

separately, can satisfy all of the NMR constraints, the NMR data can be rationalized by the assumption that the observed duplex structure represents a dynamic equilibrium among conformers which relate to models A and B as their limiting structures. The required rapid equilibrium appears feasible, since the models A and B are interconvertible by two complementary 120° counter rotations around the  $\alpha$ -axis and the  $\gamma$ -axis, respectively, of the phosphodiester backbone. The models A and B correspond to the two types of linear (idealized) single-strand backbone conformation derived previously by qualitative conformational analysis without and with allowance for *gauche-trans*-phosphodiester conformations, respectively [1] [3]. Refinement of the models A and B with the use of the program AMBER [27] by energy minimization in a water bath and molecular-dynamics simulations (2 ps, 300° K) resulted in two dynamic structures (Figs. 33 and 34, Table 4). These have roughly the same energy, closely resemble the starting structures A and B, and satisfy – as an ensemble – all of the NMR constraints without violating any *van der Waals* distances by more than 0.2 Å. Extensive fluctuations in base-pair distance and deviations from base-pair coplanarity, as well as the presence of water molecules in the cavities between some of the base pairs, were observed in both dynamic structures A and B, which, on the other hand, did not mutually interconvert within the short simulation time period used. These model properties, together with the conjectured equilibrium between the two structure types A and B, lead to the hypothesis of a homo-DNA duplex containing a ‘partially molten’ pairing core. This proposal could qualitatively account for a high rate of the NH exchange, as well as for part of the previously established [3] deficits in both enthalpic stabilization and entropic destabilization of homo-DNA duplexes relative to corresponding DNA duplexes. The phenomenon of the higher overall stability of homo-DNA duplexes *vs.* DNA duplexes (*e.g.*, [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)<sub>2</sub>,  $T_m = 59^\circ$  *vs.* [d(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)<sub>2</sub>,  $T_m = 33^\circ$ , both at  $c \approx 50 \mu\text{M}$  [3]) can then be seen as the result not only of a higher degree of conformational preorganization of the homo-DNA single strand toward the conformation of the duplex backbone [1] [3], but also of the entropic benefit of greater disorder in the central pairing zone of the homo-DNA duplex. This view of the structure of a homo-DNA duplex relates its characteristic properties to a central structural feature: the average base-pair distance in the models of homo-DNA is too large for regular base stacking (*ca.* 4.5 Å *vs.* *ca.* 3.5 Å in DNA). This difference in the distances between adjacent base pairs is a direct consequence of the *quasi*-linearity of the homo-DNA double strand as opposed to the right-handed twist of the helical DNA duplexes [1] [3], which is directly related to the specific conformational properties of pyranose rings as opposed to furanose rings [1]. Thus, the structural hypothesis derived from the NMR analysis of [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)]<sub>2</sub> relates the conformational differences between homo-DNA and DNA directly to the sugar ring size, which is the essential constitutional difference between the two types of structure.

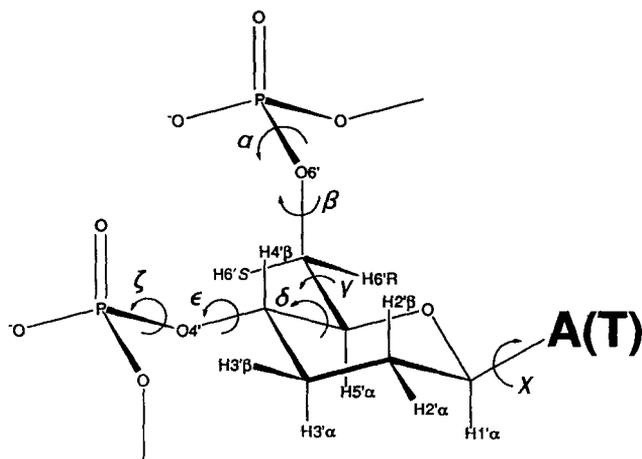
The English footnotes to Figs. 1–34, Schemes 1–9, and Tables 1–4 provide an extension of this summary.

---

**1. Einleitung.** – Das im Teil I dieser Reihe [1] eingehend begründete Projekt einer Synthese und systematischen Untersuchung der Chemie von Oligonucleotiden des Homo-DNS-Typs hat zu experimentellen Ergebnissen geführt [2] [3], welche die in der Titelfrage zum Ausdruck kommende Zielsetzung des Projekts eindrücklich rechtfertigen. Im Teil III dieser Reihe [3] haben wir erste experimentelle Beobachtungen über das Paarungsverhalten von Homo-DNS-Oligonucleotiden dokumentiert. Dabei wurden die Argumente dargelegt, nach welchen, unter Berücksichtigung von UV-, CD- und <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopischen sowie gel-elektrophoretischen Daten, Basensequenzen gezielt synthetisiert wurden, welche die Zuordnung des konstitutionellen Modus der Basenpaarung, der Paarungsstöchiometrie sowie der Strang-Orientierung von Paarungskomplexen der Homo-DNS-Reihe ermöglichten. Die dabei benutzte, an die Konstitutionsermittlung mittels chemischer Methoden erinnernde Argumentation setzt voraus, dass zwei paarende Basen unabhängig von der Basenpaar-Sequenz durchwegs den gleichen Paarungsmodus bevorzugen. Zwar bildet die durch Unterstellung dieses Postulats erreichte Kohärenz zwischen Konstitutionsbild und Gesamtheit bislang gemachter experimenteller Beobachtungen eine solide Stütze für die gewonnenen Vorstellungen über die Konstitution der Basenpaarungen in der Homo-DNS-Reihe, doch geht mit diesen Vorstellungen notgedrungenenerweise jene Art allgemeiner Unsicherheit einher, die allen mit gemischt chemisch-spektroskopischen Methoden entwickelten Konstitutionshypothesen inne-

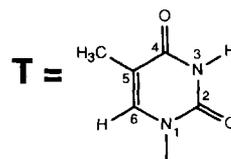
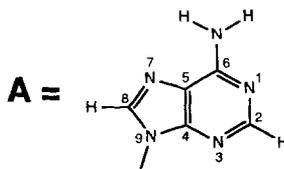
wohnt. Hier beschreiben wir eine im Laboratorium des einen von uns (*K.W.*) parallel zu – und unabhängig von – den Arbeiten zur chemischen Konstitutionszuordnung durchgeführten NMR-spektroskopischen Untersuchung des Paarungskomplexes der antiparallel-selbstkomplementären Homo-DNS-Oligonucleotid-Sequenz ddGlc(A-A-A-A-A-T-T-T-T-T)<sup>4</sup>) ( $T_m = 59^\circ$ ,  $c = 48 \mu\text{M}$  [3]). Diese spezielle Basensequenz ist deshalb ausgewählt worden, weil der Duplex der natürlichen Analogsequenz d(A-A-A-A-A-T-T-T-T-T) ( $T_m = 33^\circ$ ,  $c = 50 \mu\text{M}$  [3]) in einem anderen Zusammenhang im gleichen Laboratorium kurz zuvor einer eingehenden NMR-Analyse unterworfen worden war [7]. Die hier beschriebene NMR-Untersuchung des ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)-Paarungskomplexes hat die Konstitutionszuordnung eines nach dem *Watson-Crick-Modus* (Adenin-Thymin)-gepaarten Duplexes mit antiparalleler Strang-Orientierung bestätigt<sup>5</sup>) und gibt erstmals einen experimentell abgestützten Einblick in die Rückgrat-Konformation der Oligonucleotid-Kette

Schema 1. Idealierte Rückgrat-Konformation der Nucleotid-Einheit eines Homo-DNS-Einzelstranges [1]. Zur konfigurativen Spezifikation der Protonen vgl. Fussnote 7\*)



Idealisiertes Modell des linearen  
Homo-DNS-Einzelstranges [1] [3]  
(Phosphodiester-Konformation  
-sc/-sc)

|                      |                        |
|----------------------|------------------------|
| $\alpha = -60^\circ$ | $\delta = 60^\circ$    |
| $\beta = 180^\circ$  | $\epsilon = 180^\circ$ |
| $\gamma = 60^\circ$  | $\zeta = -60^\circ$    |



\*) Nucleotide unit of ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>) drawn in its idealized conformation with torsion angles  $\alpha = -60^\circ$ ,  $\beta = 180^\circ$ ,  $\gamma = 60^\circ$ ,  $\delta = 60^\circ$ ,  $\epsilon = 180^\circ$ ,  $\zeta = -60^\circ$  [1]. Numbering of atoms and (arbitrary) configurational designation for the diastereotopic H-atoms of the CH<sub>2</sub>(6') group are given.

<sup>4</sup>) Kurzformel: ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>).

<sup>5</sup>) Die im Teil III dieser Reihe vorgenommene Konstitution-Zuordnung der A/T-Paarung in Homo-DNS-Duplexen verwendete bereits Daten der hier beschriebenen NMR-spektroskopischen Untersuchung (vgl. [3], S. 302).

eines Homo-DNS-Duplexes. Sie gelangt dabei zum Strukturbild eines *quasi*-linearen Doppelstrangs, das in bemerkenswertem Ausmass jenem (idealisiert) linearen Homo-DNS-Einzelstrang-Modell entspricht, welches sich aus einer qualitativen Konformation-Analyse ergibt [1] und am Ausgangspunkt der Arbeiten über die Homo-DNS gestanden hat (vgl. *Schema 1*). Darüberhinaus weist sie aber auch auf die Existenz einer konformationellen Dichotomie in der *quasi*-linearen Struktur dieses Homo-DNS-Duplexes hin, durch welche sich eine abschliessende Festlegung auf eine durch einen einzelnen Atom-Koordinatensatz beschriebene Struktur vorderhand verbietet. Aus NMR-spektroskopischer Sicht von besonderem Belang ist der im Vergleich zum DNS-Duplex viel raschere Austausch der (Thymin-Adenin)-verbrückenden Imid-Protonen. Es ist dies eine anscheinend für (zumindest (Adenin-Thymin)-gepaarte) Homo-DNS-Duplexe spezifische Eigenschaft, durch welche gewisse Möglichkeiten der NMR-spektroskopischen Strukturbestimmung in der Homo-DNS-Reihe im Vergleich zur DNS-Reihe beträchtlich limitiert werden (s. unten).

**2. Messmethoden.** – Alle NMR-Messungen wurden mit einer Lösung von 8,7 mg [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] in 0,4 ml D<sub>2</sub>O (Duplex-Konzentration 3 mM, 50 mM Phosphat-Puffer, 100 mM NaCl, pH 7,0) durchgeführt.

*Tab. 1* gibt einen Überblick über die Messparameter der bei der Messtemperatur von 50° durchgeführten zweidimensionalen NMR-Experimente. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Spektren nach Standardverfahren aufgenommen [8] [9]. Alle Spektren wurden phasensensitiv mit Quadratur-Detektion in  $t_1$  unter Verwendung von TPPI [10a] bzw. States-TPPI [10b] gemessen. Im 2QF-COSY-Spektrum wurden die <sup>1</sup>H-NMR-Signale in beiden Dimensionen von <sup>31</sup>P entkoppelt. Dazu wurde ein  $\pi$ (<sup>31</sup>P)-Puls in der Mitte der Evolutionsperiode und Waltz-Entkopplung [11] während der Detektionsperiode verwendet. Das TOCSY-Spektrum wurde als 'clean TOCSY' mit MLEV-17-Mischung aufgenommen [12]. Für das (<sup>31</sup>P,<sup>1</sup>H)-COSY-Spektrum wurde die Sequenz  $\pi/2$ (<sup>31</sup>P)- $t_1$ - $\pi/2$ (<sup>31</sup>P,<sup>1</sup>H)-Detektion(<sup>1</sup>H) verwendet [13]. Das (<sup>13</sup>C,<sup>1</sup>H)-COSY-Spektrum wurde mit der Sequenz von *Bodenhausen* und *Ruben* [14] mit zusätzlichem Spinlock-Puls aufgenommen [15]. Die <sup>3</sup>J(<sup>1</sup>H $\alpha'$  $\beta$ ,<sup>31</sup>P)-Kopplungskonstanten wurden aus dem Vergleich

Tab. 1. Übersicht über die durchgeführten 2D-NMR-Experimente\*)

| Spektrum   | $t_{1\max}$<br>[ms] | $t_{2\max}$<br>[ms] | Datenmatrix<br>$t_1 \times t_2$ | <sup>1</sup> H-Frequenz<br>[MHz] | Messdauer<br>[h] |
|--|---------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------|
| [ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H]-2QF-COSY <sup>a)</sup> | 94                  | 377                 | 1024 × 4096                     | 600                              | 19               |
| [ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H]-TOCSY <sup>b)</sup>    | 45                  | 180                 | 512 × 2048                      | 600                              | 15               |
| [ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H]-NOESY <sup>c)</sup>    | 38                  | 369                 | 427 × 4096                      | 600                              | 24               |
| [ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H]-NOESY <sup>d)</sup>    | 42                  | 213                 | 400 × 2048                      | 500                              | 28               |
| [ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H]-ROESY <sup>a)</sup>    | 50                  | 168                 | 512 × 2048                      | 600                              | 24               |
| [ <sup>31</sup> P, <sup>1</sup> H]-COSY                  | 102                 | 256                 | 610 × 2048                      | 600                              | 24               |
| [ <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H]-COSY <sup>e)</sup>    | 73                  | 205                 | 2038 × 2048                     | 500                              | 94               |
| [ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H]-COSY <sup>f)</sup>     | 71                  | 369                 | 770 × 4096                      | 600                              | 2 × 6            |
| [ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H]-2QF-COSY <sup>a)</sup> | 73                  | 385                 | 800 × 4096                      | 600                              | 20               |
| [ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H]-3QF-COSY <sup>a)</sup> | 100                 | 168                 | 1220 × 2048                     | 600                              | 42               |

\*) Acquisition parameters of the 2D-NMR experiments used for the investigation of [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. <sup>a)</sup> With <sup>31</sup>P-decoupling in  $\omega_1$  and  $\omega_2$ . <sup>b)</sup> 100-ms mixing time. <sup>c)</sup> 200-ms mixing time. <sup>d)</sup> 40-ms mixing time. <sup>e)</sup> With <sup>13</sup>C-decoupling. <sup>f)</sup> With and without <sup>31</sup>P-decoupling in  $\omega_2$ . <sup>g)</sup> Without <sup>31</sup>P decoupling.

der mit und ohne  $^{31}\text{P}$ -Entkopplung gemessenen *Multiplett*-Breiten der ( $\text{H}3'\alpha \rightarrow \text{H}4'\beta$ )- und ( $\text{H}3'\beta \rightarrow \text{H}4'\beta$ )-COSY-Kreuzpeaks (zur Bezifferung vgl. *Schema 1*) bestimmt und die  $^3J(\text{H}6', ^{31}\text{P})$ -Kopplungskonstanten aus dem E.COSY-artigen *Multiplett*-Muster der ( $\text{H}6'R \rightarrow \text{H}6'S$ )-Kreuzpeaks entnommen [16], die im 2QF-COSY ohne  $^{31}\text{P}$ -Entkopplung beobachtet wurden. Eindimensionale  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren in  $\text{H}_2\text{O}$  wurden mit der Sequenz  $(\pi/2)_x(\text{selektiv})-(\pi/2)_x(\text{nicht selektiv})$ -Detektion aufgenommen, um die intensive  $\text{H}_2\text{O}$ -Resonanz zu unterdrücken [17]. Für den selektiven Puls wurde eine 5 ms lange, *Gauss*-förmig modulierte DANTE-Sequenz verwendet [18]. Eindimensionale  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren von  $(1,3\text{-}^{15}\text{N}(\text{T}))[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  wurden bei 36,5 MHz aufgenommen, wobei je nach Experiment 11 000 bis 23 000 Scans mit einer Relaxationsperiode von 2,3 s aufaddiert wurden. Alle Messungen wurden auf *Bruker-AM*- und *-AMX*-Spektrometern durchgeführt.

**3. Resultate.** – Wie die in *Fig. 1* abgebildeten  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des Paarungskomplexes zeigen, sind die Linienbreiten und die chemischen Verschiebungen temperaturabhängig. Die Signalbreiten bei Raumtemperatur sind deutlich grösser als im entsprechen-

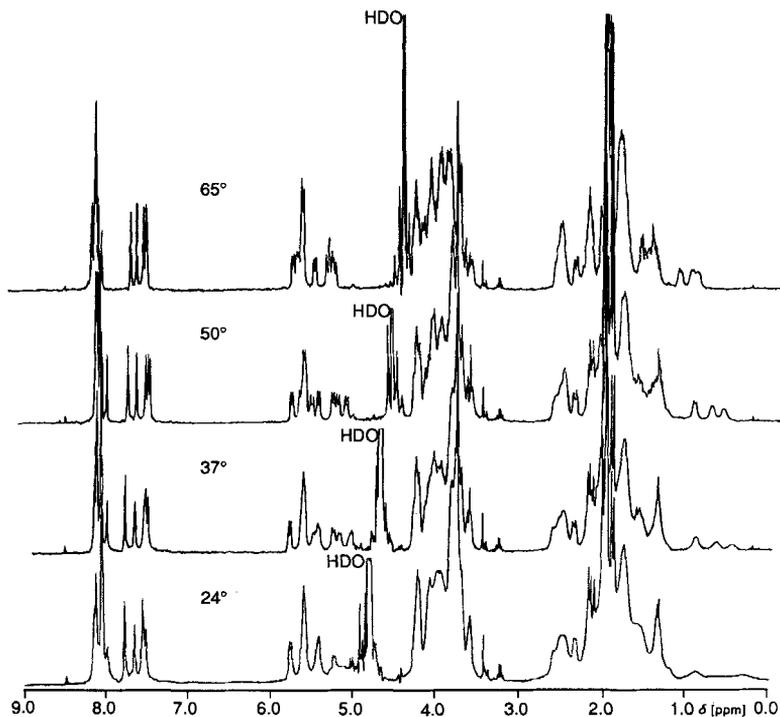


Fig. 1.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  bei verschiedenen Messtemperaturen\*)

\*) 1D- $^1\text{H}$ -NMR spectrum of  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  as a function of temperature. Optimal spectral resolution is obtained around 50°; at room temperature, significant line broadening is observed for some of the resonances, while at 65° the onset of signal coalescence is observed. The  $T_m$  value for the duplex at the concentration used for the NMR measurements (ca. 3 mM) is estimated to be ca. 80° [3] [6].

den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des natürlichen  $[\text{d}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$ ; dabei sind einzelne Signale selektiv und temperaturabhängig verbreitert (vgl. z. B. die Hochfeldresonanzen zwischen 0,0 und 1,0 ppm). UV-spektroskopische Beobachtungen<sup>6)</sup> weisen darauf hin, dass bei höheren Konzentrationen als  $50\ \mu\text{M}$  unterhalb  $40^\circ$  eine zusätzliche Aggregation stattfindet. Im Konzentrationsbereich  $0,5\ \text{mM}$  bis  $10\ \text{mM}$  mit und ohne Salz-Puffer werden keine Veränderungen der Linienbreite beobachtet. Die beste spektrale Auflösung wird bei einer Messtemperatur um  $50^\circ$  beobachtet. Bei  $65^\circ$  zeigt das Zusammenrücken der Resonanzen (Fig. 1) partielle Denaturierung des Paarungskomplexes an [8]. UV-spektroskopisch lässt sich aus den Schmelzkurven im Konzentrationsbereich  $5\text{--}110\ \mu\text{M}$  [3] [6] für  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  ein Schmelzpunkt von  $80^\circ$  bei der verwendeten NMR-Messkonzentration ( $3\ \text{mM}$ ) abschätzen.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  in  $\text{D}_2\text{O}$  (Fig. 2) zeigt vier gut unterscheidbare Signalbereiche: von  $0,4\text{--}2,5\ \text{ppm}$  die Signale der  $\text{CH}_2\text{-H}$ -Atome  $\text{H}2'\alpha, \beta$  und  $\text{H}3'\alpha, \beta$  der Pyranose-Ringe (Schema 1) sowie die Signale der Thymin-Me-Gruppen; von

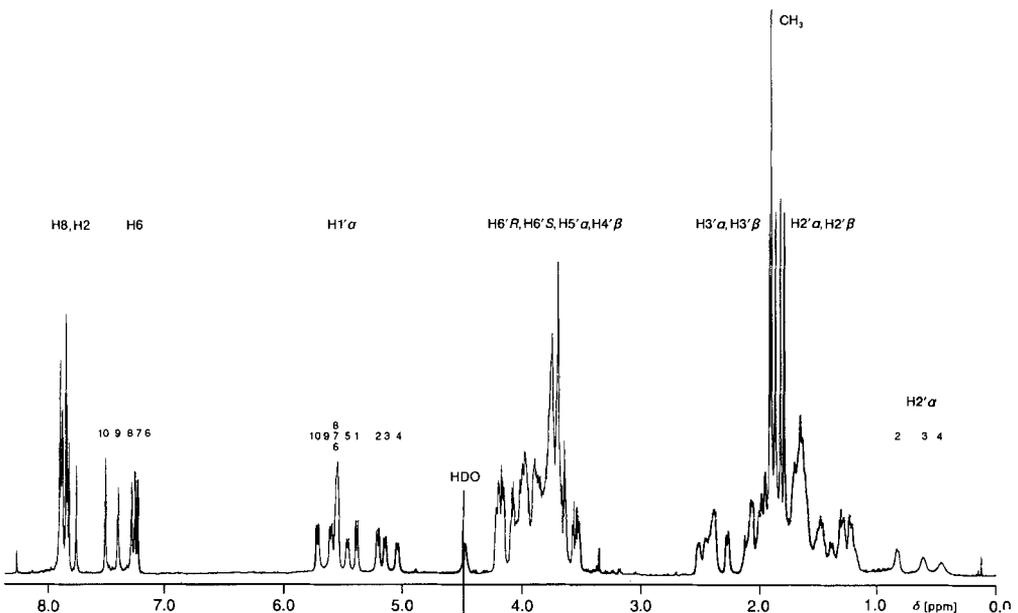


Fig. 2.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  in  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $50^\circ$  (Duplex-Konzentration =  $3\ \text{mM}$ ,  $50\ \text{mM}$  Phosphat-Puffer,  $100\ \text{mM}$  NaCl, pH 7.0,  $^1\text{H}$ -Messfrequenz =  $600\ \text{MHz}$ \*)

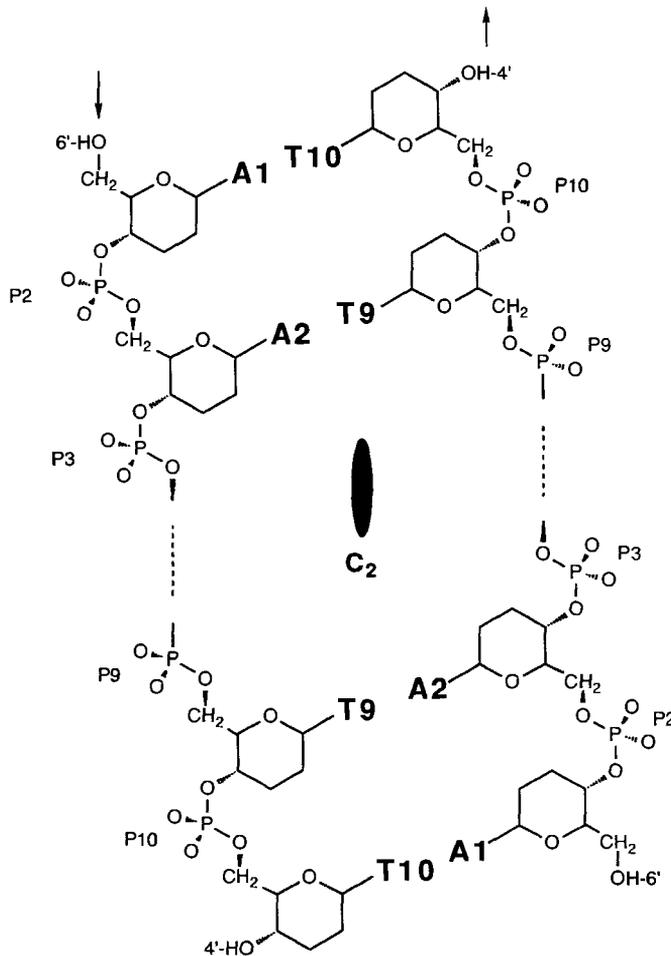
\*)  $600\text{-MHz}$   $^1\text{H-NMR}$  spectrum of  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  at  $50^\circ$ . All NMR measurements were carried out on a sample containing  $8.7\ \text{mg}$  of material (Na salt) in  $0.4\ \text{ml}$  of  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $0.05\ \text{M}$  sodium phosphate,  $0.1\ \text{M}$  NaCl,  $0.1\%$  (w/v)  $\text{NaN}_3$ , pH 7.0. The number of ( $\text{H}1'\alpha$ ), ( $\text{T-CH}_3$ ), and ( $\text{T-H}_6$ ) signals (Scheme 1) corresponds to the twofold symmetry of the duplex structure (Scheme 2). As in the spectrum of  $[\text{d}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  of the natural series [7], the resonances appear in four clearly separated spectral regions (assignments given in the Figure).

<sup>6)</sup> Schmelzkurven ab einer Nucleotid-Konzentration von  $50\ \mu\text{M}$  weisen bei  $260\ \text{nm}$  im Bereich zwischen  $0^\circ$  und  $40^\circ$  eine Hypochromizität (ca. 5%) und erst dann eine Hyperchromizität (ca. 20%) auf.

3,5–4,2 ppm die Signale der geminal zu einem O-Atom stehenden Protonen H4'β, 5'α und H6'S,R; von 5,0–5,8 ppm die zu zwei Heteroatomen geminal stehenden H1'α-Protonen sowie von 7,4–8,1 ppm die an C-Atom gebundenen Basenprotonen H6, H2 und H8. Ein Vergleich mit dem Spektrum des analogen Decanucleotid-Duplexes [d(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)<sub>2</sub>] der natürlichen Reihe [7] zeigt, dass die Verteilung der Resonanzlinien in den beiden Spektren sehr ähnlich ist.

Der Signalbereich für die H1'α-Protonen erstreckt sich sowohl für [d(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)<sub>2</sub>] als auch für [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)<sub>2</sub>] über 0,8 ppm, wobei für die insgesamt 20 H1'α-Protonen des Decamer-Duplexes im Einklang mit einer C<sub>2</sub>-Symmetrie (Schema 2) zehn Resonanzen beob-

Schema 2. Konstitution und Konfiguration des Duplexes von ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>) mit antiparalleler Strang-Orientierung\*)



\*) Overview of constitution, configuration, and antiparallel (C<sub>2</sub>-symmetric) arrangement of the ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)<sub>2</sub> duplex. Numbering of nucleotide units, starting from the CH<sub>2</sub>OH end (C(6')OH end) is given.

achtet werden (im Spektrum durch Numerierung der jeweiligen Nucleotid-Einheit zugeordnet). Diese Symmetrie äussert sich auch darin, dass für die je 10 H6-Protonen und Me-Gruppen der Thymin-Basen nur je fünf Resonanzen beobachtet werden.

Bei Oligonucleotid-Duplexen des B-DNS-Typs basiert die sequentielle Zuordnung der  $^1\text{H}$ -NMR-Resonanzen üblicherweise auf der Beobachtung von NOEs zwischen den  $\text{H}1'\alpha$ - oder  $\text{H}2'\alpha,\beta$ -Desoxyribose-Ringprotonen und den Basenprotonen des eigenen, sowie der in  $5'$ -Richtung folgenden Nucleotid-Einheit [8]. Da die Beobachtbarkeit dieser NOEs konformationsabhängig ist [8], wurde die sequentielle Zuordnung der  $^1\text{H}$ -Resonanzen des Zucker-Rückgrates von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  ausschliesslich über skalare Kopplungen vorgenommen [10c], wobei die ( $^1\text{H}, ^1\text{H}$ )-Kopplungen in den [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-TOCSY- und [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-COSY-Spektren und die ( $^{31}\text{P}, ^1\text{H}$ )-Kopplungen im [ $^{31}\text{P}, ^1\text{H}$ ]-COSY-Spektrum beobachtet wurden. Nur die sequenz-spezifische Zuordnung der Basenprotonen resultierte aus intra- und internucleotidischen NOEs zwischen Zucker- und Basenprotonen, da zwischen den Spinsystemen der Zucker und der Basen mit der hier verwendeten Methodik keine skalaren Kopplungen aufgelöst werden konnten. Eine unabhängige Bestätigung der intranucleotidischen Zuordnungen wurde mit einem [ $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ ]-COSY-Spektrum erhalten. Das Ergebnis aller  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{31}\text{P}$ -Resonanz-Zuordnungen ist in Tab. 2 zusammengestellt. Nachstehend wird im Detail beschrieben, wie die  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{31}\text{P}$ -Signale sequenz-spezifisch zugeordnet werden.

Tab. 2.  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{31}\text{P}$ -chemische Verschiebungen von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  in ppm\*)

|     | $1'\alpha$ | C(1) | $2'\alpha$ | $2'\beta$ | C(2) | $3'\alpha$ | $3'\beta$ | C(3) | $4'\beta$ | C(4) | $5'\alpha$ | C(5) | $6'R$ | $6'S$ | C(6) | 2    | 8    | $^{31}\text{P}$ |                 |
|-----|------------|------|------------|-----------|------|------------|-----------|------|-----------|------|------------|------|-------|-------|------|------|------|-----------------|-----------------|
| A1  | 5.38       | 90.9 | 1.25       | 1.32      | 37.6 | 1.49       | 2.07      | 37.9 | 3.70      | 78.0 | 3.52       | 90.4 | 3.64  | 3.55  | 70.2 | 8.08 | 8.00 |                 |                 |
| A2  | 5.20       | 90.8 | 0.82       | 1.62      | 36.2 | 1.41       | 2.07      | 37.8 | 3.73      | 78.0 | 3.70       | 88.4 | 4.02  | 3.86  | 73.4 | 8.04 | 8.06 | -3.15           |                 |
| A3  | 5.14       | 90.4 | 0.61       | 1.64      | 36.0 | 1.32       | 2.01      | 37.8 | 3.77      | 77.8 | 3.68       | 87.9 | 4.01  | 3.89  | 72.8 | 8.03 | 8.09 | -3.82           |                 |
| A4  | 5.04       | 89.9 | 0.45       | 1.65      | 35.9 | 1.21       | 1.99      | 37.7 | 3.80      | 77.7 | 3.63       | 87.8 | 3.98  | 3.90  | 72.5 | 8.02 | 8.06 | -3.94           |                 |
| A5  | 5.46       | 89.8 | 1.79       | 2.11      | 37.1 | 1.61       | 2.38      | 38.1 | 3.99      | 78.1 | 3.76       | 88.0 | 4.06  | 3.95  | 72.9 | 7.94 | 8.07 | -3.99           |                 |
|     |            |      |            |           |      |            |           |      |           |      |            |      |       |       |      |      |      |                 | $\text{CH}_3$ 6 |
| T6  | 5.54       | 90.2 | 1.67       | 1.50      | 37.4 | 1.66       | 2.39      | 38.1 | 3.73      | 79.2 | 3.73       | 88.9 | 4.21  | 3.84  | 74.6 | 1.81 | 7.42 | -3.62           |                 |
| T7  | 5.56       | 89.9 | 1.68       | 1.54      | 37.2 | 1.68       | 2.42      | 37.8 | 3.75      | 79.1 | 3.75       | 89.3 | 4.17  | 3.87  | 74.2 | 1.84 | 7.45 | -3.08           |                 |
| T8  | 5.55       | 90.1 | 1.71       | 1.67      | 37.2 | 1.71       | 2.46      | 38.2 | 3.82      | 78.9 | 3.76       | 89.3 | 4.18  | 3.90  | 74.1 | 1.88 | 7.48 | -3.03           |                 |
| T9  | 5.60       | 90.5 | 1.90       | 1.94      | 37.0 | 1.84       | 2.52      | 38.6 | 3.96      | 78.7 | 3.79       | 89.1 | 4.21  | 3.98  | 73.9 | 1.92 | 7.59 | -3.20           |                 |
| T10 | 5.71       | 91.3 | 1.96       | 2.01      | 37.8 | 1.73       | 2.27      | 39.8 | 3.70      | 73.7 | 3.70       | 90.4 | 4.16  | 4.08  | 74.2 | 1.91 | 7.70 | -3.13           |                 |

\*)  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ , and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts of all protons, P-atoms, and pyranose C-atoms as well as of selected adenine and thymine C-atoms of the decanucleotide duplex  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  in  $\text{D}_2\text{O}$  at pH 7.0 and  $T = 50^\circ$ .

3.1. *Intranucleotidische Zuordnungen.* Die Kopplungssysteme der Pyranose-Ringe wurden anhand eines [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-TOCSY-Experimentes aufgeklärt. Fig. 3 zeigt eine Gesamtansicht des TOCSY-Spektrums. In diesem Spektrum werden in Schnitten entlang der  $\omega_1$ -Achse bei den  $\omega_2$ -chemischen Verschiebungen der  $\text{H}1'\alpha$ -Protonen zwischen 5 und 6 ppm die Kreuzpeaks mit allen anderen zum jeweils gleichen Pyranose-Ring gehörenden Protonen gefunden. Die  $^1\text{H}$ -Resonanzfrequenzen sind für die Kopplungssysteme aller Pyranose-Ringeinheiten erfassbar (Fig. 2), und das [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-COSY-Spektrum wird nur zur Aufklärung von geminalen und vicinalen Beziehungen zwischen Protonen innerhalb

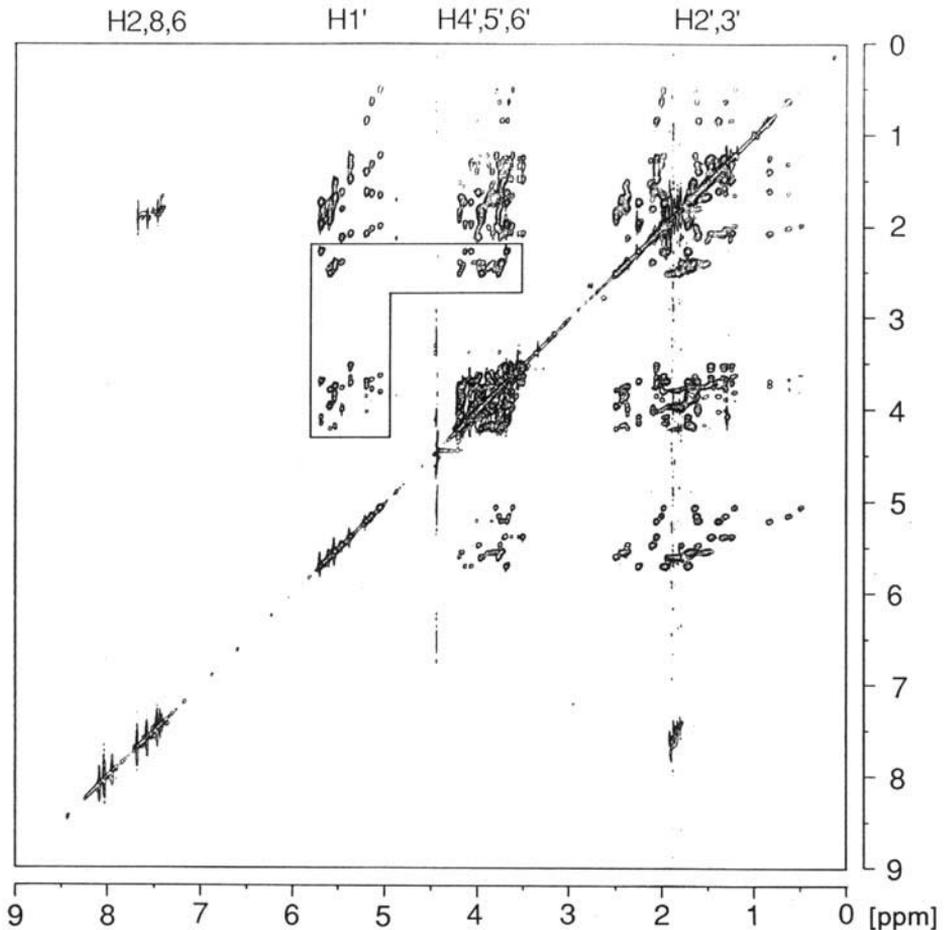


Fig. 3. 2D- $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -TOCSY-Spektrum (600 MHz, 50°,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  (Gesamtansicht)\*)

\*)  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -TOCSY spectrum of  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  at 50° in  $\text{D}_2\text{O}$  solution. The framed spectral region is shown on larger scale in Fig. 9.

der einzelnen Spin-Systeme sowie zur Unterscheidung von skalaren *gauche*- und *trans*-Kopplungen zwischen vicinalen Protonen benötigt.

Die Gesamtansicht des  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -COSY-Spektrums (Fig. 4) zeigt, dass alle relevanten Kreuzpeaks in fünf voneinander getrennten spektralen Bereichen liegen: Kreuzpeaks zwischen den  $\text{H}2'\alpha,\beta$ - und den  $\text{H}1'\alpha$ -Protonen liegen im Ausschnitt A, Ausschnitt B enthält die Kreuzpeaks zwischen den  $\text{H}3'\alpha,\beta$ - und den  $\text{H}4'\beta$ -Protonen, Ausschnitt C diejenigen zwischen den  $\text{H}2'\alpha,\beta$ - und  $\text{H}3'\alpha,\beta$ -Protonen, Ausschnitt D diejenigen zwischen den  $\text{H}4'\beta$ -,  $\text{H}5'\alpha$ - und  $\text{H}6'R(S)$ -Protonen und Ausschnitt E die Kreuzpeaks zwischen den Me-Gruppen und den H6-Protonen der Thymin-Basen.

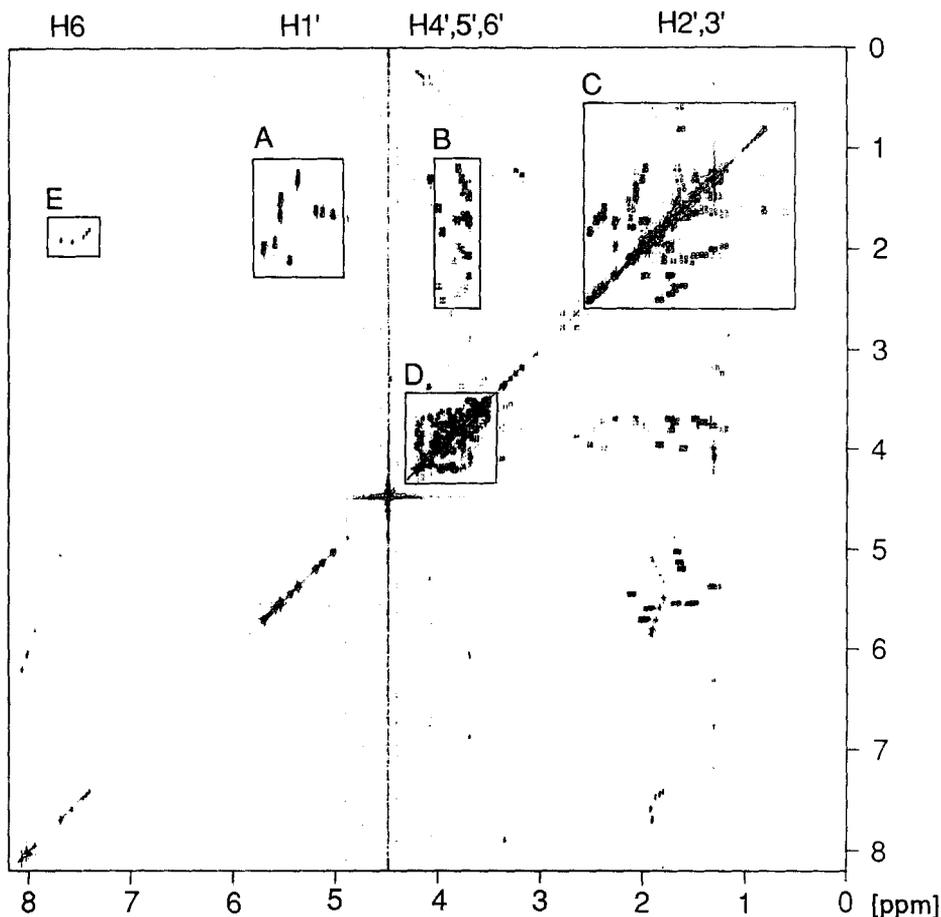


Fig. 4. 2D- $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -2QF-COSY-Spektrum (600 MHz, 50°,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  (Gesamtansicht)\*)

- \*)  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -2QF-COSY Spectrum of  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  at 50° in  $\text{D}_2\text{O}$ . Boxes define the spectral regions A-E: A: cross peaks between  $\text{H}2'\alpha, \beta$  and  $\text{H}1'\alpha$ ; B: cross peaks between  $\text{H}3'\alpha, \beta$  and  $\text{H}4'\beta$ ; C: cross peaks between  $\text{H}2'\alpha, \text{H}2'\beta, \text{H}3'\alpha$ , and  $\text{H}3'\beta$ ; D: cross peaks between  $\text{H}4'\beta, \text{H}5'\alpha, \text{H}6'\text{R}$  and  $\text{H}6'\text{S}$ ; E: allylic coupling cross peaks between H6 and  $\text{CH}_3$  of thymine.

Im Ausschnitt A des COSY-Spektrums von Fig. 4 (Fig. 5) werden die zehn ( $\text{H}2'\beta \rightarrow \text{H}1'\alpha$ )-Kreuzpeaks beobachtet. Nur die  $\text{H}1'\alpha$ -Resonanzen von A1 und T10 zeigen Kreuzpeaks zu beiden benachbarten  $\text{H}2'$ -Protonen. Allgemein weisen die terminalen Nucleotide aufgrund ihrer erhöhten Beweglichkeit schmalere Signale auf als die anderen Nucleotide, so dass die kleineren Kopplungen zwischen den  $\text{H}1'\alpha$ - und den synklinal stehenden  $\text{H}2'\alpha$ -Protonen auch aufgelöst werden können, während für alle anderen Nucleotide nur die grössere Kopplungskonstante zum axialen  $\text{H}2'\beta$ -Proton zu intensiven COSY-Kreuzpeaks führt.

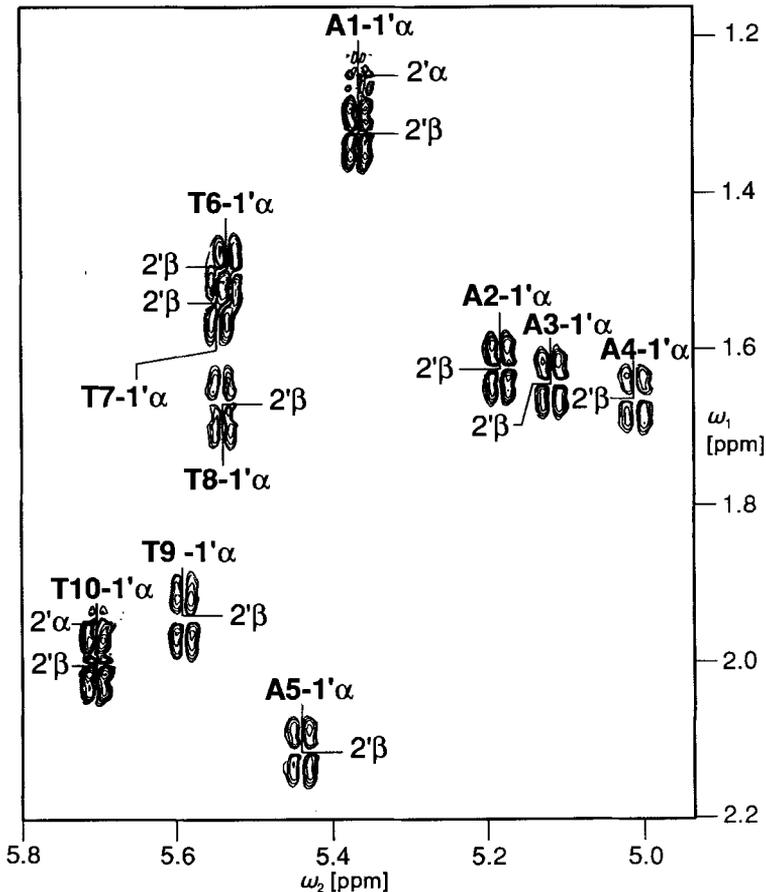


Fig. 5. Ausschnitt A des [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-2QF-COSY-Spektrums von Fig. 4\*)

\*) Spectral region A of the [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-2QF-COSY spectrum of Fig. 4: All  $\text{H}1'\alpha$ -protons give cross peaks with large coupling constants to the antiperiplanar  $\text{H}2'\beta$  protons, in agreement with the chair conformation of the pyranose ring (Scheme 1).  $\text{H}2'\alpha \rightarrow \text{H}1'\alpha$  cross peaks are observed only for the terminal residues A1 and T10 which have narrower lineshapes.

Von Ausschnitt C, der die Kreuzpeaks zwischen den geminalen  $\text{H}2'\alpha$ - und  $\text{H}2'\beta$ - bzw.  $\text{H}3'\alpha$ - und  $\text{H}3'\beta$ -Protonen und die Kreuzpeaks zwischen den vicinalen  $\text{H}2'$ - und  $\text{H}3'$ -Protonen enthält, zeigt Fig. 6 die ( $\text{H}3'\alpha \rightarrow \text{H}3'\beta$ )-Kreuzpeaks aller Nucleotid-Einheiten, sowie die ( $\text{H}3'\alpha \rightarrow \text{H}2'\beta$ )-Kreuzpeaks der Nucleotide A1–A4 (Fig. 6, a), A5 und T10 (Fig. 6, b). Die *Multiplett*-Struktur der ( $\text{H}3'\alpha \rightarrow \text{H}2'\beta$ )-Kreuzpeaks entspricht einer aktiven Kopplungskonstante von ca. 10 Hz. Trotzdem sind die ( $\text{H}3'\alpha \rightarrow \text{H}2'\beta$ )-Kreuzpeaks relativ schwach und fehlen völlig für die Nucleotide T6–T9, weil beide Kopplungspartner weitere passive Kopplungen gleicher Grössenordnung aufweisen.

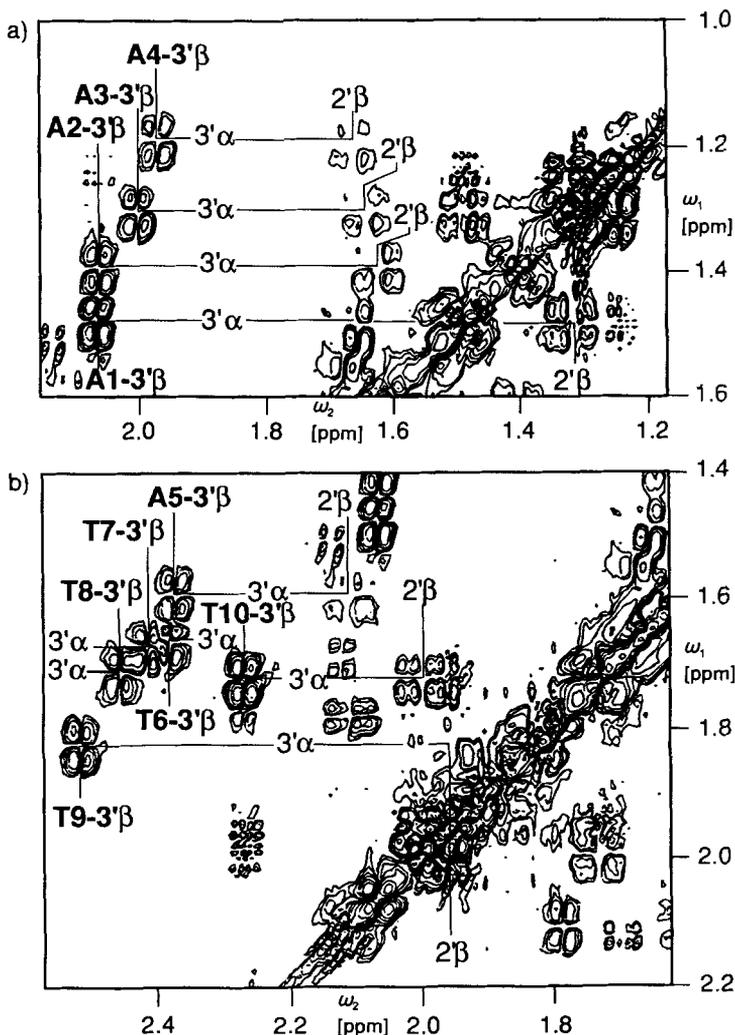


Fig. 6. Ausschnitt C des  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -2QF-COSY-Spektrums von Fig. 4 ( $\text{H}3'\alpha \rightarrow \text{H}2'\beta$ )-Kreuzpeaks der Nucleotide A1–A4 in Fig. 6, a, bzw. der Nucleotide A5 und T10 in Fig. 6, b)\*

\*) Two areas from region C of the  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -2QF-COSY spectrum of a) nucleotide units A1–A4, b) nucleotide units A5–T10. The geminal  $\text{H}3'\alpha$ - $\text{H}3'\beta$  connectivities and the vicinal  $\text{H}3'\alpha \rightarrow \text{H}2'\beta$  cross peaks are identified. The multiplet patterns of the  $\text{H}3'\alpha \rightarrow \text{H}2'\beta$  cross peaks are in agreement with an active coupling constant of ca. 10 Hz between the  $\text{H}3'\alpha$  and  $\text{H}2'\beta$  protons, but their overall intensity is weak due to the presence of two further, passive large couplings for both coupling partners. For T6–T9, the  $\text{H}3'\alpha \rightarrow \text{H}2'\beta$  cross peaks are either overlapping with other cross peaks, or they are too weak to be seen.

Die Kreuzpeaks  $\text{H}3'\alpha \rightarrow \text{H}4'\beta$  bzw.  $\text{H}3'\beta \rightarrow \text{H}4'\beta$  (Fig. 7; Ausschnitt B von Fig. 4) liegen in zwei entlang  $\omega_1$  recht gut getrennten spektralen Bereichen. Die Resonanzen bei höherem Feld entlang  $\omega_1$  in Fig. 7 haben durchwegs grössere Kopplungskonstanten  $^3J(\text{H}3', \text{H}4')$  und sind deshalb axialen  $\text{H}3'\alpha$ -Protonen zuzuordnen, wogegen die Reso-

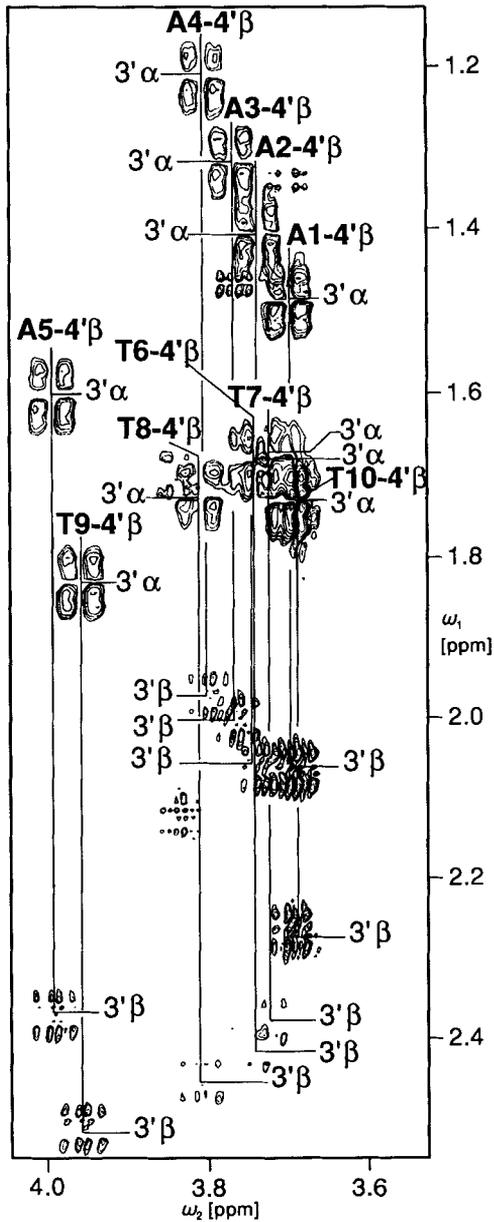


Fig. 7. Ausschnitt B des  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]\text{-}2\text{QF-COSY-Spektrums}$  von Fig. 4\*)

\*) Spectral region B of the  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]\text{-}2\text{QF-COSY}$  spectrum of Fig. 4 containing the cross peaks  $\text{H}3'\alpha \rightarrow \text{H}4'\beta$  and  $\text{H}3'\beta \rightarrow \text{H}4'\beta$ . The  $\text{H}3'\alpha$  and the  $\text{H}3'\beta$  protons show a large and a small active coupling constant to the  $\text{H}4'\beta$  proton, respectively, in agreement with the chair conformation shown in Scheme 1.

nanz bei tieferem Feld und mit kleineren Kopplungskonstanten  $^3J(^1\text{H}3',^1\text{H}4')$  äquatorialen  $\text{H}3'\beta$ -Protonen zugehören.

Die Signale der Kopplungssysteme  $\text{H}4'\beta \rightarrow \text{H}5'\alpha$ ,  $\text{H}5'\alpha \rightarrow \text{H}6'R$  bzw.  $\text{H}5'\alpha \rightarrow \text{H}6'S$  und  $\text{H}6'R \rightarrow \text{H}6'S$ <sup>7)</sup> liegen im am stärksten von Signal-Überlagerung gekennzeichneten Ausschnitt *D* (Fig. 8). In diesem sowohl für die sequentielle Zuordnung, als auch für die Konformationsanalyse des Rückgrates (vgl. Abschn. 5.2) wichtigen Spektralbereich sind die folgenden Kreuzpeaks identifiziert: Für die Nucleotide A1, A3–A5 und T9 jene von  $\text{H}5'\alpha \rightarrow \text{H}4'\beta$  (Fig. 8a), für sämtliche 10 Nucleotide jene von  $\text{H}5'\alpha \rightarrow \text{H}6'R$  und für die Nucleotide A1–A5 und T10 jene von  $\text{H}5'\alpha \rightarrow \text{H}6'S$  (Fig. 8, b). Die entsprechenden, nicht zugeordneten Kreuzpeaks der übrigen Nucleotide liegen entweder sehr nahe der Diagonalen oder überlappen so stark mit anderen Kreuzpeaks, dass sie nicht aufgelöst werden konnten.

Die Zuordnungen der  $\text{H}6'R$ - und  $\text{H}6'S$ -Resonanzen<sup>7)</sup> zu den Kopplungssystemen der einzelnen Nucleotide ergab sich durch die Kombination von Informationen aus den [ $^1\text{H},^1\text{H}$ ]-COSY- und [ $^1\text{H},^1\text{H}$ ]-TOCSY-Spektren. Fig. 9 zeigt (rechts unten) die Region *D* aus dem [ $^1\text{H},^1\text{H}$ ]-COSY-Spektrum der Fig. 4 mit den intensiven Kreuzpeaks der geminalen ( $\text{H}6'S \rightarrow \text{H}6'R$ )-Korrelationen, sowie die drei Bezirke des in Fig. 3 eingerahmten Ausschnitts aus dem [ $^1\text{H},^1\text{H}$ ]-TOCSY-Spektrum mit den Kreuzpeaks zwischen den  $\text{H}6'R(S)$ - und den  $\text{H}1'\alpha$ - und  $\text{H}3'\beta$ -Resonanzen. Wie am Beispiel der Nucleotid-Einheit A3 gezeigt, gibt es bei den chemischen Verschiebungen der  $\text{H}6'R(S)$ -Protonen, wie sie durch die ( $\text{H}6'S \rightarrow \text{H}6'R$ )-COSY-Kreuzpeaks definiert werden, im TOCSY-Spektrum die entsprechenden ( $\text{H}6'S \rightarrow \text{H}1'\alpha$ )- und ( $\text{H}6'R \rightarrow \text{H}1'\alpha$ )-Korrelationen. Für T6, T7 und T8, für welche die  $\text{H}1'\alpha$ -Signale überlagert sind, wird die Zuordnung zum Kopplungssystem aus dem Vergleich der ( $\text{H}6'S \rightarrow \text{H}6'R$ )-COSY-Kreuzpeaks mit den ( $\text{H}3'\beta \rightarrow \text{H}6'R(S)$ )-TOCSY-Kreuzpeaks gewonnen, wie am Beispiel T7 gezeigt ist.

Die Zuordnungen der Kopplungssysteme der Pyranose-Ringe wurden auf unabhängige Weise durch ein [ $^{13}\text{C},^1\text{H}$ ]-COSY-Spektrum bestätigt. Das [ $^{13}\text{C},^1\text{H}$ ]-COSY-Spektrum gliedert sich im aliphatischen Bereich in fünf voneinander isolierte spektrale Bereiche: Der erste Bereich (nicht abgebildet) enthält die im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zwischen 5,0 und 5,8 ppm liegenden Signale der  $\text{H}1'\alpha$ -Protonen und ermöglicht die Zuordnung der  $^{13}\text{C}(1')$ -Resonanzen zwischen 89 und 91 ppm. Der im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum schlecht aufgelöste Bereich der  $\text{H}4'\beta$ -,  $\text{H}5'\alpha$ - und  $\text{H}6'R(S)$ -Resonanzen zwischen 3,5 und 4,4 ppm (vgl. Fig. 4) wird entlang der  $^{13}\text{C}$ -Achse in drei Bereiche zerlegt, die aufgrund der Kenntnis der chemischen Verschiebungen der betreffenden Protonen leicht zugeordnet werden können: Von 70–75 ppm die  $\text{C}(6')$ -Atome, von 77–80 ppm die  $\text{C}(4')$ -Atome (Fig. 10, oben), sowie von 87–91 ppm die  $\text{C}(5')$ -Atome (Fig. 10, unten). Der fünfte Spektralbereich liegt im Protonenresonanz-Bereich von 0,4–2,6 ppm ( $\text{H}2'\alpha,\beta$ ,  $\text{H}3'\alpha,\beta$ ) und ergibt Kreuzpeaks mit den  $\text{C}(2')/\text{C}(3')$ -Atomen im  $^{13}\text{C}$ -Frequenz-Bereich von 35–40 ppm (nicht abgebildet).

Im [ $^{13}\text{C},^1\text{H}$ ]-COSY-Spektrum unterscheiden sich die  $\text{CH}_2$ -Gruppen der 2', 3'- und 6'-Pyranose-Ring-Positionen von den  $\text{CH}$ -Gruppen der 1', 4'- und 5'-Positionen dadurch, dass sie zwei Kreuzpeaks bei derselben  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebung ergeben. Fig. 10 zeigt diese Verhältnisse beispielhaft für die  $\text{CH}_2(6')$ -Gruppen. Das [ $^{13}\text{C},^1\text{H}$ ]-COSY-

<sup>7)</sup> Die konfigurative Bezeichnung  $\text{H}6'R$  und  $\text{H}6'S$  für die  $\text{CH}_2(6')$ -Protonen ist *arbiträr* und für diese Arbeit durch das Formelbild in Schema 1 festgelegt. Die Begründung der Zuordnung des  $\text{H}6'S$ -Protons zum Signal bei höherem und des  $\text{H}6'R$ -Protons zu jenem bei tieferem Feld erfolgt in Abschn. 3.2.

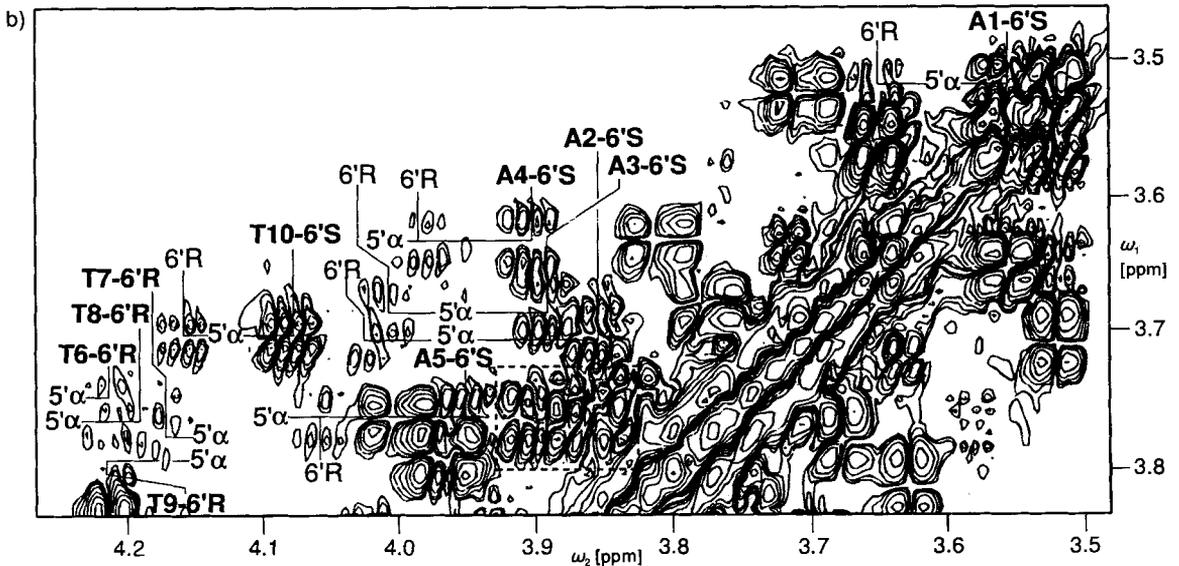
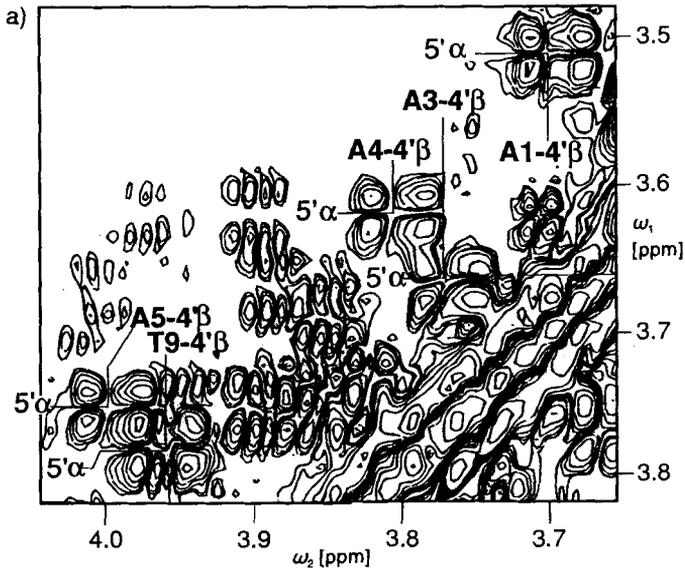


Fig. 8. Ausschnitt D des  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -2QF-COSY-Spektrums von Fig. 4 (( $\text{H}5'\alpha \rightarrow \text{H}4'\beta$ )-Kreuzpeaks in Fig. 8, a, ( $\text{H}5'\alpha \rightarrow \text{H}6'R(S)$ )-Kreuzpeaks in Fig. 8, b)\*

\*) Two areas from the spectral region D of the  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -2QF-COSY spectrum of Fig. 4. a) Cross peaks between  $\text{H}5'\alpha$  and  $\text{H}4'\beta$  protons of A1, A3-A5 and T9. The multiplet patterns agree with the large active coupling constant expected for  $\delta = 60^\circ$  (Scheme 1). All other  $\text{H}5'\alpha \rightarrow \text{H}4'\beta$  cross peaks could not be resolved. b) Cross peaks between  $\text{H}5'\alpha$  and  $\text{H}6'R(S)$  protons. The dashed frame identifies the spectral region with the overlapping  $\text{H}5'\alpha \rightarrow \text{H}6'S$  cross peaks of T6-T8. Small active couplings are observed for all  $\text{H}5'\alpha \rightarrow \text{H}6'R(S)$  cross peaks, with slightly higher intensities for the  $\text{H}5'\alpha \rightarrow \text{H}6'S$  cross peaks than for the  $\text{H}5'\alpha \rightarrow \text{H}6'R$  cross peaks. This finding indicates a *gauche*-conformation for both  $\text{H}6'$  protons relative to the  $\text{H}5'\alpha$  protons, corresponding to a  $\gamma$  torsion angle near  $60^\circ$  as in Scheme 1.



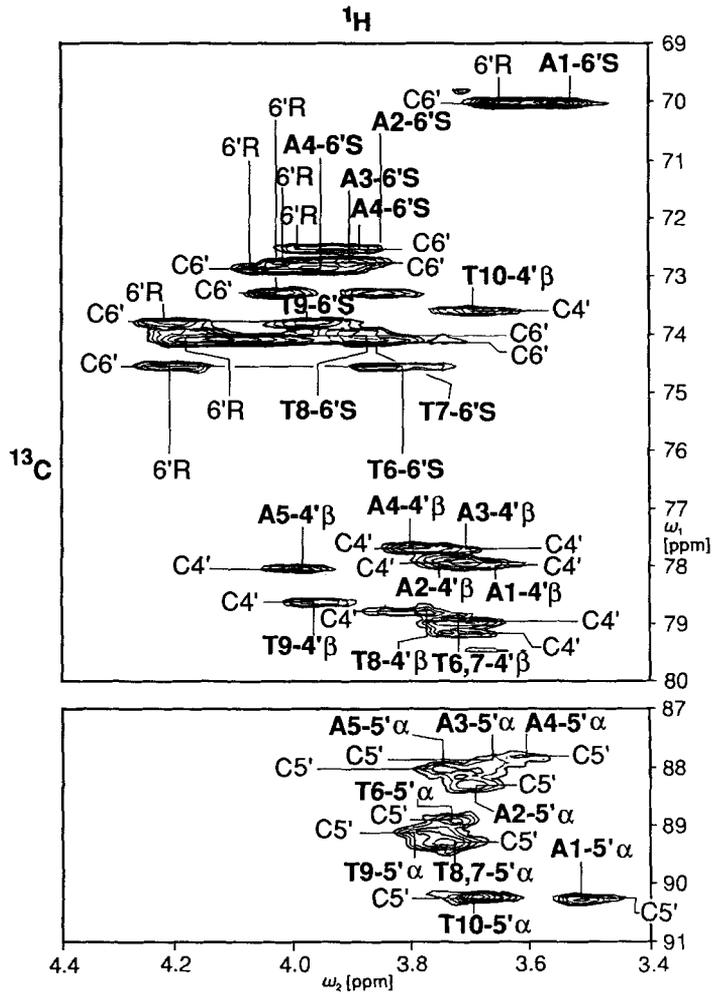


Fig. 10. Ausschnitte aus dem  $[^{13}\text{C}, ^1\text{H}]$ -COSY-Spektrum ( $^1\text{H}$ -Frequenz = 500 MHz,  $50^\circ$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2^*$

\*)  $[^{13}\text{C}, ^1\text{H}]$ -COSY Spectrum of  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  in  $\text{D}_2\text{O}$  solution at  $T = 50^\circ$  ( $^{13}\text{C}$  at natural isotope abundance).  $^1\text{H}$  chemical-shift degeneracies are lifted by the spread in the  $^{13}\text{C}$  dimension. The cross peaks of the  $\text{C}(5')$ -atoms are broadened in the  $^{13}\text{C}$  dimension due to the presence of two large vicinal  $^{13}\text{C}, ^{31}\text{P}$  couplings.

← Fig. 9. Rechts unten: Gesamtausschnitt des Bereichs D des  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -2QF-COSY-Spektrums in Fig. 4; übrige: Ausschnitte des in Fig. 3 eingerahmten Bereichs des  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -TOCSY-Spektrums\*)

\*) Combined plot of the spectral region D of the  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -2QF-COSY spectrum of Fig. 4 and of the framed spectral regions in the  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -TOCSY spectrum of Fig. 3. The chemical shifts defined by the intense  $\text{H}6'S \rightarrow \text{H}6'R$  COSY cross peaks are compared with the  $\text{CH}_2(6') \rightarrow \text{H}1'\alpha$  (example A3) and  $\text{H}3'\beta \rightarrow \text{CH}_2(6')$  TOCSY cross peaks (example T7), in order to link the  $\text{CH}_2(6')$  resonances with the other proton resonances of the sugar spin systems.

Spektrum bestätigte auch die Entartung der  $^1\text{H}$ -chemischen Verschiebungen der  $\text{H}4'\beta$ - und  $\text{H}5'\alpha$ -Resonanzen von T6, T7 und T10 (Tab. 2) durch das getrennte Auftreten der ( $^{13}\text{C}(4') \rightarrow ^1\text{H}4'\beta$ )- und ( $^{13}\text{C}(5') \rightarrow ^1\text{H}5'\alpha$ )-Kreuzpeaks.

Im aromatischen Bereich zwischen 7 und 9 ppm (vgl. Fig. 2) ist es leicht, die H6-Protonen der Thymin-Basen durch die allylische Kopplung zur benachbarten Me-Gruppe von den H2,8-Protonen der Adenin-Basen ohne Kreuzpeaks im [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-COSY-Spektrum (vgl. Ausschnitt E in Fig. 4) zu unterscheiden. Die intranucleotidische Zuordnung der Protonen im aromatischen Bereich zu den aliphatischen Kopplungssystemen der Zucker-Reste erfolgte durch das [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-NOESY-Spektrum (Fig. 11). In den Ausschnitten D

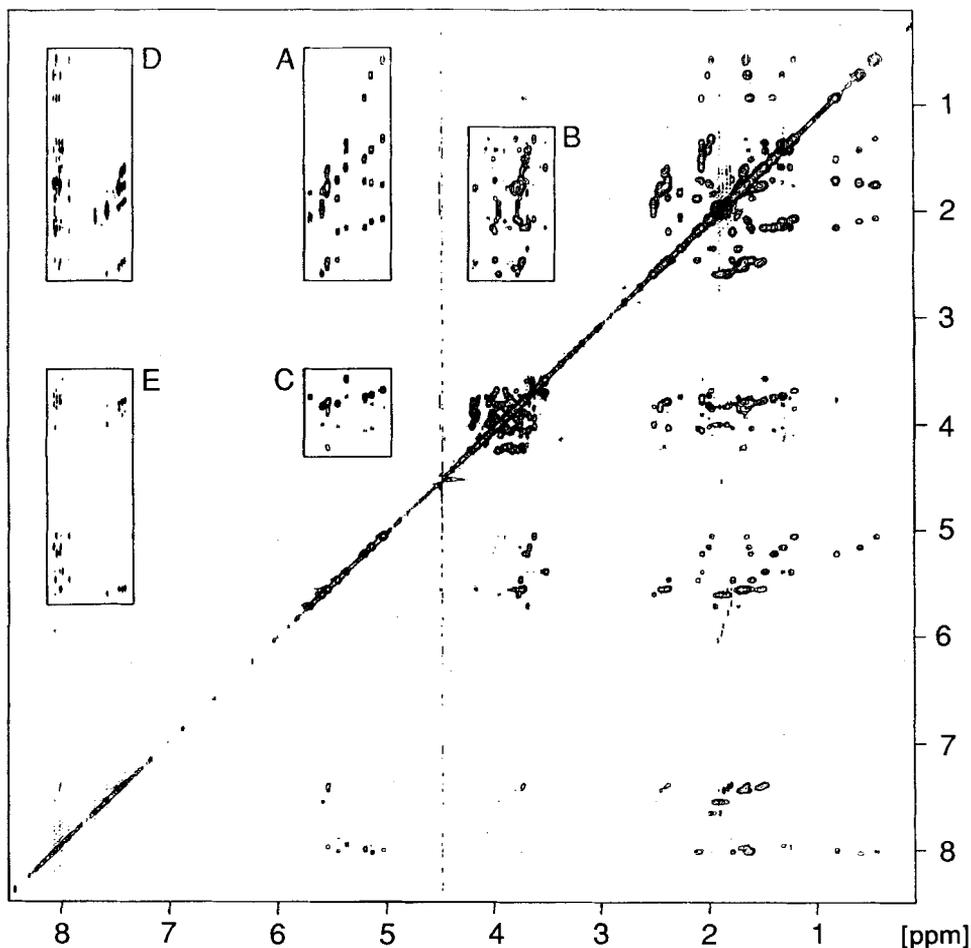


Fig. 11. [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-NOESY-Spektrum (600 MHz,  $t_{\text{mix}} = 200$  ms,  $50^\circ$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2^*$

\*) [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-NOESY Spectrum of  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  at  $50^\circ$  in  $\text{D}_2\text{O}$  solution, recorded with a mixing time of 200 ms: Framed spectral regions: A and C: NOEs from  $\text{H}1'\alpha$  to pyranose-ring protons; B: intraresidual cross peaks with the  $\text{H}4'\beta$ ,  $\text{H}5'\alpha$ , and  $\text{H}6'R(S)$ , and sequential NOEs from  $\text{H}3'\alpha$  and  $\text{H}3'\beta$  to  $\text{H}6'R(S)$ ; D and E: NOEs between sugar protons and base protons.

und *E* dieses NOESY-Spektrums (Fig. 12, *a* und *b*) ergeben sämtliche H6-Thymin-Resonanzen und alle H8-Adenin-Resonanzen NOE-Kreuzpeaks zu nahezu allen Protonen einzelner Pyranose-Ring-Kopplungssysteme. Diese Kreuzpeaks wurden den aufgrund der chemischen Konstitution der Nucleotide erwarteten, intranucleotidischen NOEs zugeordnet. In Übereinstimmung damit wurden die stärksten NOEs mit H2' $\alpha$ , H2' $\beta$  und H1' $\alpha$  beobachtet (Fig. 12, *a* und *b*). Eine entsprechende intranucleotidische Zuordnung zum Zucker kann für die H2-Resonanzen der Adenin-Kerne nicht in analoger Weise erhalten werden, da für diese Protonen keine intranucleotidischen NOEs beobachtet

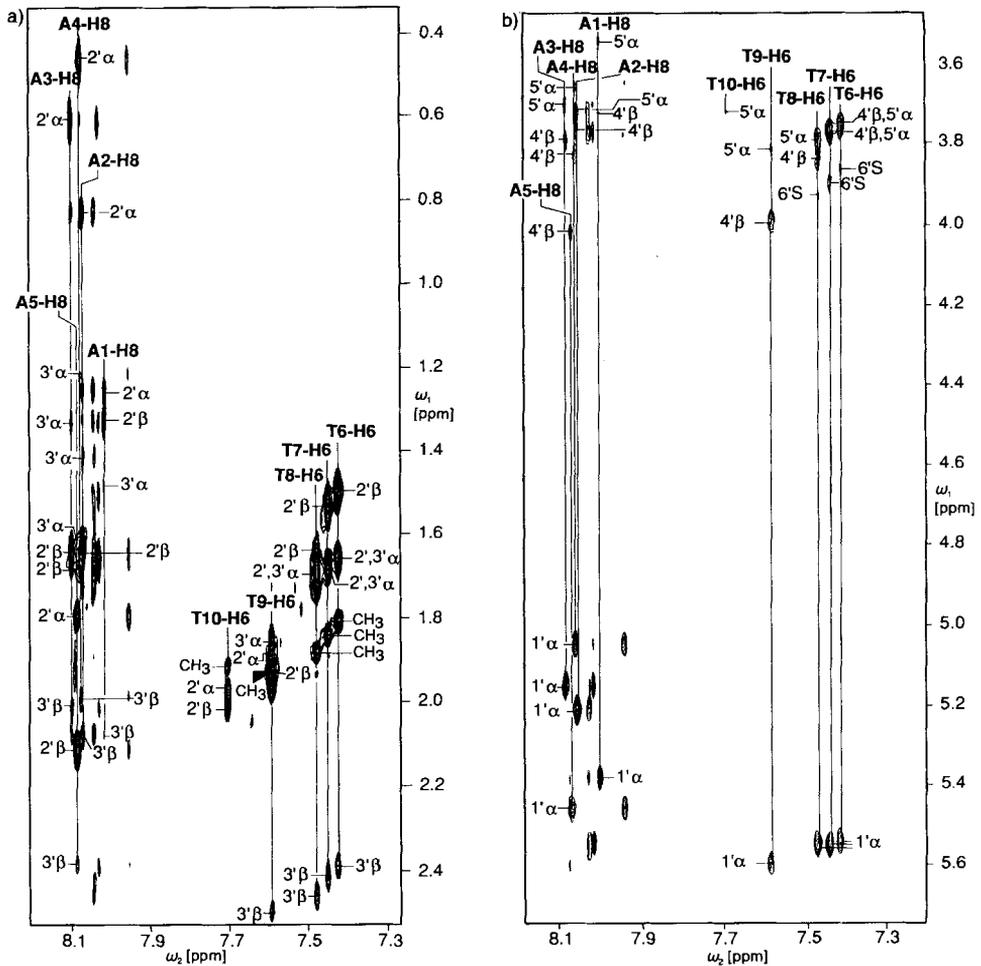


Fig. 12. Ausschnitte D und E des [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-NOESY-Spektrums von Fig. 11\*)

\*) Spectral regions *D* (Fig. 12, *a*) and *E* (Fig. 12, *b*) of the [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-NOESY spectrum of Fig. 11, showing the intranucleotide NOEs between sugar protons and adenine protons H8 and thymine protons H6.

werden [8]. Die Zuordnung dieser H2-Resonanzen wurde in der Folge im Zusammenhang mit der sequentiellen Resonanz-Zuordnung erhalten (Abschn. 3.2).

3.2. *Sequentielle Zuordnungen.* Da am Ausgangspunkt dieser Studie der Konformationstyp des ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)-Paarungskomplexes nicht sichergestellt war, wären sequentielle Resonanz-Zuordnungen *via* [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H]-NOEs *a priori* nicht zuverlässig gewesen [8]. Deshalb wurde von der Zuordnungsmethode von Pardi *et al.* [10c] ausgegangen, und die Grundlage der sequentiellen Zuordnung der Resonanzen der einzelnen Nucleotid-Einheiten bildete das [<sup>31</sup>P,<sup>1</sup>H]-COSY-Spektrum (Fig. 13). Dieses enthält neun <sup>31</sup>P-Resonanz-Frequenzen in der ω<sub>1</sub>-Dimension, wobei jedes <sup>31</sup>P-Signal über <sup>3</sup>J(<sup>31</sup>P,<sup>1</sup>H)-Kopplungen mit jeweils einer H6'R-, einer H6'S- und einer H4'β-Resonanz verknüpft ist. Alle zehn H4'β-Resonanzen von [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)<sub>2</sub> weisen unterschiedliche chemische Verschiebungen auf (vgl. Fig. 7), und keines der (H6'S/H6'R)-Protonenpaare ist in beiden <sup>1</sup>H-Resonanz-Frequenzen mit einem anderen (H6'S/H6'R)-Protonenpaar entartet (vgl. Fig. 9), so dass die sequentielle Resonanz-Zuordnung auf einfache Weise durch das [<sup>31</sup>P,<sup>1</sup>H]-COSY-Spektrum festgelegt werden konnte.

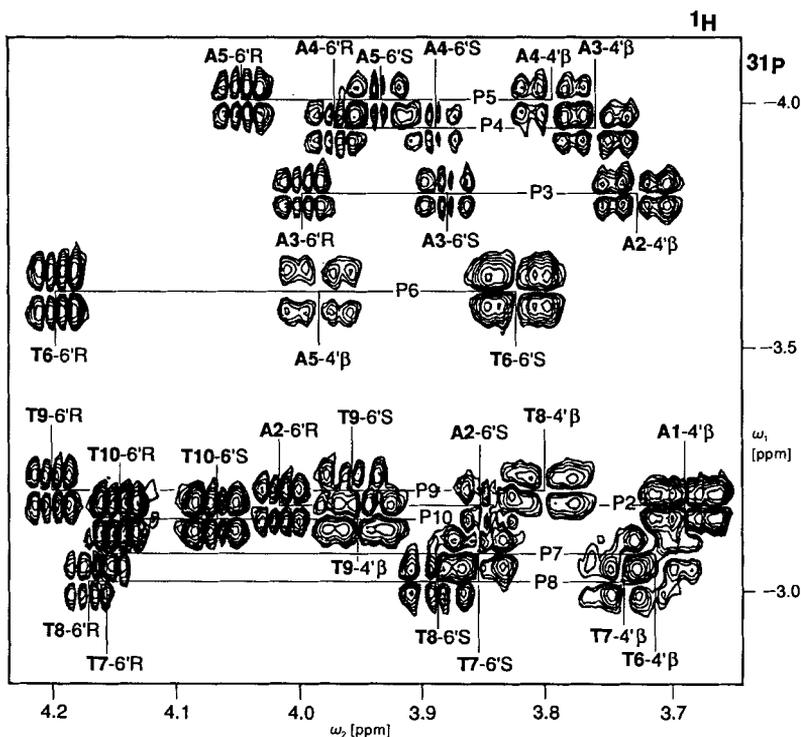


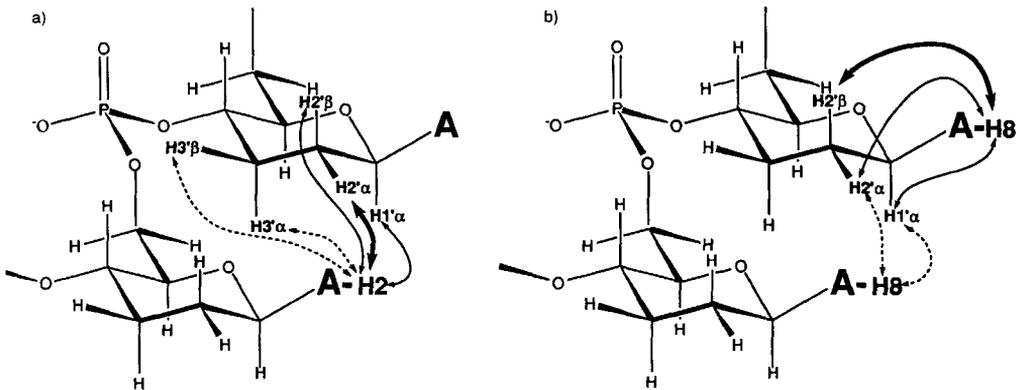
Fig. 13. [<sup>31</sup>P,<sup>1</sup>H]-COSY-Spektrum (<sup>1</sup>H-Frequenz = 600 MHz, 50°, D<sub>2</sub>O) von [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)<sub>2</sub>]\*)

\*) [<sup>31</sup>P,<sup>1</sup>H]-COSY Spectrum of [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)<sub>2</sub> in D<sub>2</sub>O solution at 50°. All nine P-atoms are coupled *via* three-bond couplings with one H6'R, H6'S, and H4'β proton each, thus defining the sequential connectivity between two adjacent nucleotides. The <sup>31</sup>P resonances P(3)–P(5) of the adenine segment are at higher field than the resonances P(7)–P(10) of the thymine segment, the P(6) resonance being in between (see also Fig. 26). <sup>31</sup>P Chemical-shift referencing is relative to external trimethyl phosphate.

Ausgangspunkte waren die 6'- und 4'-Enden des Oligonucleotid-Duplexes; deren Protonen treten wegen der fehlenden terminalen Phosphat-Gruppen (vgl. *Schema 2*) nicht im  $^{31}\text{P}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum auf, und die chemischen Verschiebungen liegen bei höherem Feld als alle übrigen  $\text{H}6'R(S)$ - bzw.  $\text{H}4'\beta$ -Resonanzen. Die sequentielle Zuordnung der  $^{31}\text{P}$ -Signale zeigt, dass die  $^{31}\text{P}$ -Signale des  $\text{ddGlc}(A_5)$ -Segments bei höherem Feld liegen als die des  $\text{ddGlc}(T_5)$ -Segments.

Mit der sequentiellen Resonanz-Zuordnung der endocyclischen Pyranose-Ring- $\text{CH}_2$ -Gruppen ergab sich schliesslich auch die Zuordnung der  $\text{H}2$ -Protonen der Adenin-Basen, indem jeweils NOEs zu den  $\text{H}1'$ -,  $\text{H}2'$ - und  $\text{H}3'$ -Protonen des in 6'-Richtung sequentiell benachbarten Nucleotides (*Schema 3, a*) identifiziert werden konnten (*Fig. 14*). Die

Schema 3. Intranucleotidische und sequentielle NOEs von Pyranose-Ring- zu Adenin-Basen-Protonen\*)



\*) Observed NOEs between sugar protons of nucleotide unit  $i$  with adenine protons of sequentially succeeding nucleotide unit  $i + 1$  (*Fig. 14*): a) sequential NOEs used to assign the adenine-H2 resonances, b) intra- and internucleotide NOEs involving the adenine-H8 protons. The sequential NOEs  $\text{H}2'\alpha(i) \rightarrow \text{H}8(i + 1)$  and  $\text{H}1'\alpha(i) \rightarrow \text{H}8(i + 1)$  are much weaker than in the natural DNA series.

$\text{H}2$ -Protonen der Adenin-Basen von  $\text{A}1$  und  $\text{A}5$  nehmen dabei insofern eine Sonderstellung ein, als entsprechende NOEs im endständigen Nucleotid  $\text{A}1$  notwendigerweise fehlen, und bei  $\text{A}5$  neben den sequentiellen NOEs zu  $\text{A}4$  auch NOEs zu den eigenen Zucker-Protonen gefunden wurden, die nur als Interstrang-NOEs zwischen den beiden symmetrieverwandten  $\text{A}5$ -Nucleotiden gedeutet werden können. Die Zuordnung des  $\text{H}2$ -Protons von  $\text{A}1$  wurde durch Interstrang-NOEs festgelegt, die im *Abschn. 4.1* besprochen werden.

Beim Struktur-Typ der natürlichen B-DNS beruht die Strategie der sequentiellen  $^1\text{H}$ -Resonanz-Zuordnung auf der räumlichen Nähe der  $\text{H}6$ - bzw.  $\text{H}8$ -Basenprotonen zu den  $\text{H}1'\alpha$ - und  $\text{H}2'\alpha,\beta$ -Protonen sowohl der intranucleotidischen, als auch der in 5'-Richtung sequentiell benachbarten 2'-Deoxyribose-Einheit, die beide zu leicht beobachtbaren NOEs Anlass geben [8]. Bei der  $^1\text{H}$ -Resonanz-Zuordnung von  $[\text{ddGlc}(A_5-T_5)]_2$  versagt diese Strategie, weil die sequentiellen NOEs  $\text{H}1'\alpha(i) \rightarrow \text{H}8(i + 1)$  und  $\text{H}2'\alpha(i) \rightarrow \text{H}8(i + 1)$

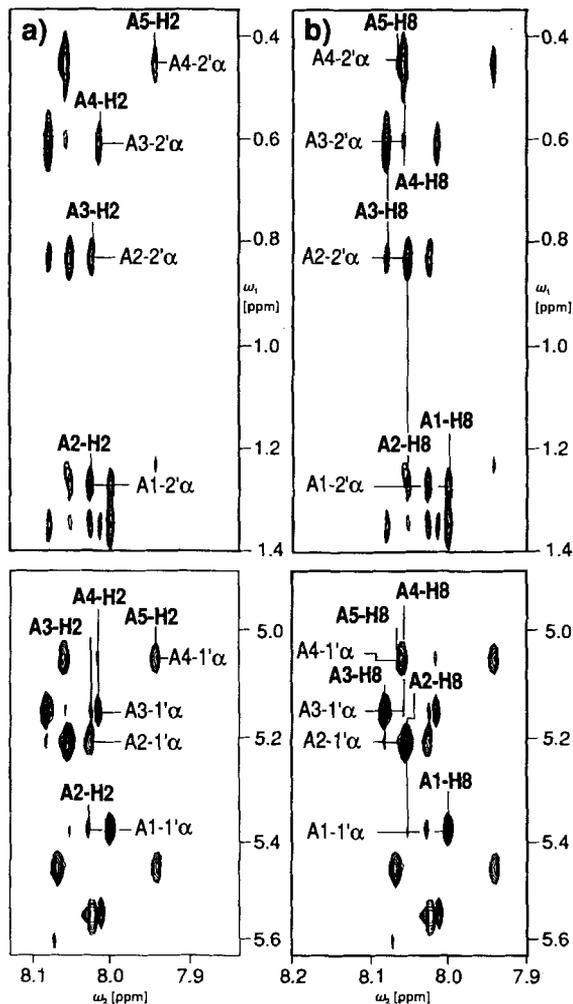


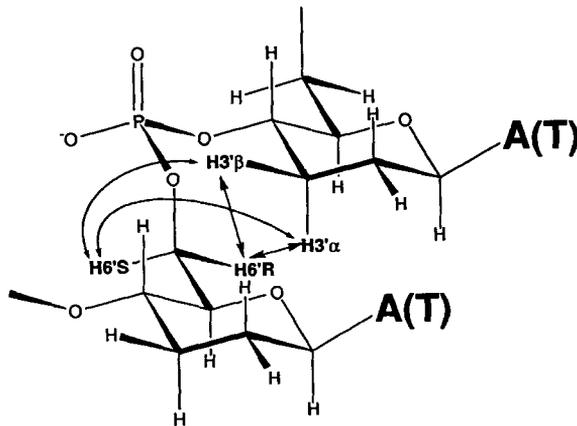
Fig. 14. Ausschnitte aus den Spektralbereichen D und E des [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H]-NOESY-Spektrums von Fig. 11, die sequentielle NOEs zwischen Pyranose-Ring- und Adenin-Protonen enthalten\*)

\*) Parts of the spectral regions D and E of the [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H]-NOESY spectrum of Fig. 11. a) Sequential H2' $\alpha$  → H2 and H1' $\alpha$  → H2 NOEs used to assign the H2 resonances of the adenine bases (Scheme 3, a). b) Sequential assignments via the pathways H8(i)-H2' $\alpha$ (i)-H8(i+1) and H8(i)-H1' $\alpha$ (i)-H8(i+1), starting from the H8 resonance of A1 (Scheme 3, b). In contrast to the natural series [8], sequential assignments in the A1-A5 segment of [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)<sub>2</sub>] via these pathways are non-trivial (weak NOE intensities, see Fig. 14 and Scheme 3, b), and not feasible at all in the T5-T10 segment.

im ddGlc(A<sub>5</sub>)-Segment (Scheme 3, b) auch bei 200 ms Mischzeit im NOESY-Experiment sehr schwach sind (Fig. 14), und die entsprechenden NOEs H1' $\alpha$ (i) → H6(i+1) und H2' $\alpha$ (i) → H6(i+1) im ddGlc(T<sub>5</sub>)-Segment völlig fehlen (oder gegebenenfalls mit intranucleotidischen Kreuzpeaks überlagert sind).

Die konfigurative Unterscheidung der CH<sub>2</sub>-Protonen in den Pyranose-Kopplungssystemen ergab sich für die 2'- und 3'-Positionen ohne Schwierigkeiten aus dem COSY-Kopplungsmuster, in dem antiperiplanar-vicinale Protonenpaare durch grosse (ca. 10 Hz) und synclinal-vicinale Protonenpaare durch kleinere (ca. 5 Hz)  $^3J(\text{H},\text{H})$ -Kopplungskonstanten gekennzeichnet sind (vgl. Fig. 5–7). Für die H6'*R*- und H6'*S*-Protonen<sup>7)</sup> wurde die konfigurative Zuordnung aufgrund der folgenden Überlegungen vorgenommen: Soweit die (H5' $\alpha$  → H6'*R*(*S*))-Kreuzpeaks im COSY-Spektrum aufgelöst sind (Fig. 8, b), werden für *beide* H6'-Protonen *kleine*  $^3J(\text{H},\text{H})$ -Kopplungskonstanten beobachtet. Dies entspricht dem Konformationstyp der zweifach synclinalen Anordnung der CH<sub>2</sub>(6')-Protonen bezüglich des H5' $\alpha$ -Protons ( $\gamma = 60^\circ$ ; vgl. Schema 1). In dieser Anordnung werden gemäss Schema 4 für das H6'*R*-Proton stärkere NOEs zu den H3' $\alpha$ -

Schema 4. Sequentielle NOEs von Pyranose-Ring- zu Pyranose-Ring-Protonen<sup>\*)</sup>



<sup>\*)</sup> Sequential NOEs between H3' $\alpha,\beta$  protons of nucleotide unit *i* with H6'*R*(*S*) protons of the succeeding nucleotide unit *i* + 1 (Fig. 15).

und H3' $\beta$ -Protonen des sequentiell vorhergehenden Nucleotides erwartet als für das H6'*S*-Proton. Fig. 15 zeigt, dass solche Intensitätsunterschiede in der Tat beobachtet werden, wobei sie im ddGlc(A<sub>5</sub>)-Segment stärker ausgeprägt sind als im ddGlc(T<sub>5</sub>)-Segment; diese Intensitätsunterschiede sind die Grundlage zu den in Fig. 15 vorgenommenen (*R*)/(*S*)-Zuordnungen der H6'-Protonensignale.

3.3. Beobachtungen zur Doppelstrang-Bildung. In [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H]-NOESY-Spektren von (A/T)-gepaarten Oligonucleotiden der natürlichen Reihe sind die H2-Protonen der Adenin-Basen Ausgangspunkt von Interstrang-NOEs mit den unmittelbar benachbarten, labilen Imid-Protonen der Komplementärbase Thymin und den nicht-labilen H1' $\alpha$ -Deoxyribose-Ring-Protonen des gegenüberliegenden Stranges (vgl. [8] S.219). Im NOESY-Spektrum von [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)]<sub>2</sub> wurden mehrere NOEs zwischen den H2-Adenin-Protonen und den Pyranose-Ring-Protonen des im Partnerstrang sequentiell in 4'-Richtung

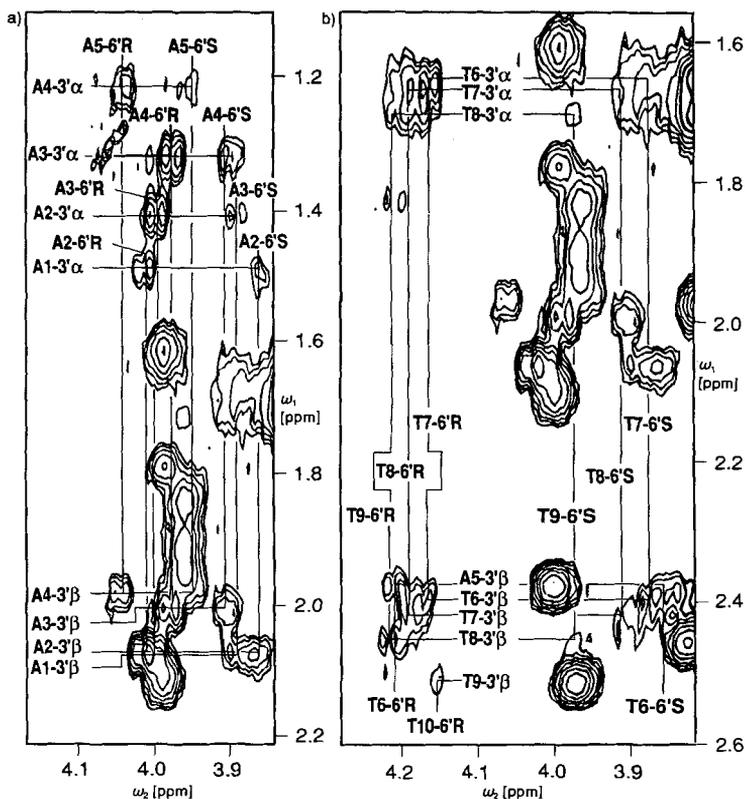


Fig. 15. Ausschnitte aus dem Spektralbereich B des  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY-Spektrums von Fig. 11 zur Identifikation des sequentiellen NOEs mit  $\text{CH}_2(6')^*$

- \*) Part of the spectral region B of the  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY spectrum of Fig. 11 showing sequential  $\text{H}3'\alpha,\beta \rightarrow \text{H}6'R(S)$  NOEs. The more intense NOEs are assigned to involve the  $\text{H}6'R$  protons as against the  $\text{H}6'S$  protons (Schemes 1 and 4). This assignment is based on a  $\gamma$  value of ca.  $60^\circ$  as suggested by the small  $^3J(^1\text{H}5'\alpha, ^1\text{H}6'R)$  and  $^3J(^1\text{H}5'\alpha, ^1\text{H}6'S)$  coupling constants observed with COSY (Fig. 8, b). a) Sequential connectivities A1-A5; b) sequential connectivities A5-T10.

nächstfolgenden Nucleotides beobachtet (Schema 5). So wiesen sämtliche fünf H2-Adenin-Protonen Interstrang-NOEs zu den Pyranose-Ring-Protonen  $\text{H}2'\alpha,\beta$  und  $\text{H}3'\beta$  auf (z. B. A1-H2 zu T9-H2' $\alpha,\beta$ ,  $\text{H}3'\beta$ ). Die H2-Protonen von A1, A2, A3 und A4 zeigten zudem NOEs zu den  $\text{H}1'\alpha$ -Protonen von T9, T8, T7 und T6 (Fig. 16). Weitere Interstrang-NOEs, welche allerdings nur bei 200 ms Mischzeit beobachtet wurden, bildeten Kreuzpeaks der H2-Adenin-Protonen mit den H6-Thymin-Protonen des sequentiell nächstfolgenden Nucleotides im Partnerstrang (z. B. A2-H2 zu T8-H6). Der Gesamtheit dieser Interstrang-NOEs kommt der Rang eines NMR-spektroskopischen Beweises der antiparallelen Strang-Orientierung im  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$ -Duplex zu.

Scheme 5. *Interstrand-NOEs\**

\*) Observed *interstrand* NOEs between adenine-H2 protons of nucleotide unit *i* (e.g. A2) with sugar and thymine protons of the *opposite* strand's nucleotide unit (10 - *i*)(T8) (Fig. 16). These observations confirm the antiparallel strand orientation in [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)<sub>2</sub>].

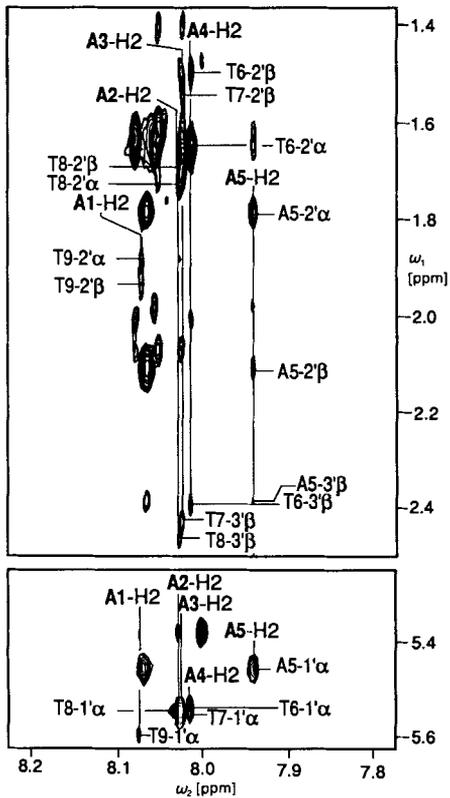
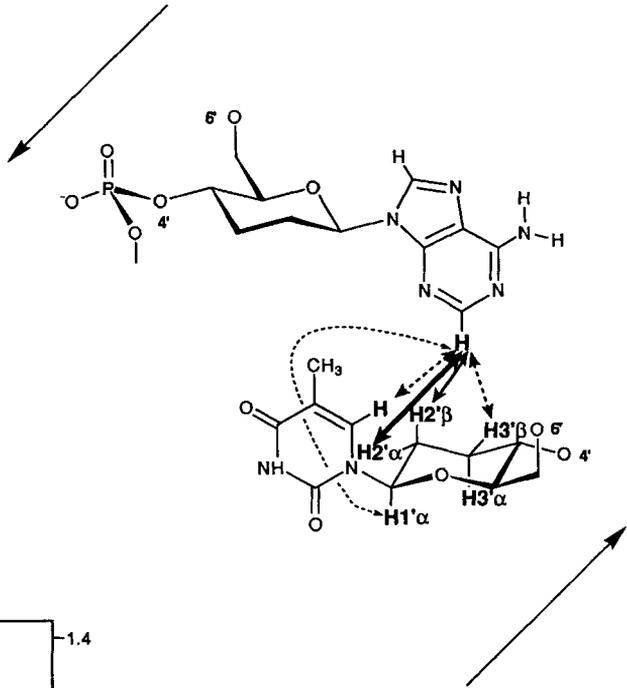


Fig. 16. Ausschnitte aus den Bereichen D und E des [<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H]-NOESY-Spektrums von Fig. 11\*)

\*) Parts of the spectral regions D and E of the [<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H]-NOESY spectrum of Fig. 11 showing *interstrand* cross peaks between H2 resonance of adenine *i* with resonances of the sugar (10 - *i*) of the opposite strand (Scheme 5), which has, therefore, the antiparallel orientation.

In  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren natürlicher DNS-Duplexe in  $\text{H}_2\text{O}$  werden die Signale der in Duplex-Paarungen involvierten Imid-Protonen der Thymin-Base bei 13–14 ppm<sup>8)</sup> und diejenigen der Amino-Protonen der Adenin-Base bei 8–9 ppm beobachtet (vgl. [8], S. 33). Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  weist gegenüber jenem von  $[\text{d}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  Unterschiede auf, welche den direkten NMR-spektroskopischen Nachweis der NH-Protonen beträchtlich erschweren. Trotz der höheren Denaturierungstemperatur des Homo-DNS-Duplexes [3] erfolgt der Austausch der Imid-Protonen mit  $\text{H}_2\text{O}$  so rasch, dass ihr Signal ab 30° mit dem  $\text{H}_2\text{O}$ -Signal koalesziert und damit im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nicht mehr als separate Linie beobachtet wird. Die Spektren von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  wurden darum (im Gegensatz zur sonstigen Messtemperatur von 50°) bei einer Temperatur von 4° aufgenommen, bei welcher die Signale, wenn auch stark verbreitert, beobachtbar sind. Wird unter diesen Bedingungen selektiv auf der Frequenz von  $\text{H}_2\text{O}$  eingestrahlt, nimmt die Intensität des NH-Signals bei tiefstem Feld am wenigsten ab, so dass dieses Signal den für das Lösungsmittel am schwierigsten zugänglichen Imid-Protonen im Zentrum des Doppelstranges zuzuordnen ist (Fig. 17, a und b). Die Tatsache, dass die Imid-Proton-Signale bei  $\text{H}_2\text{O}$ -Sättigung *nicht vollständig* verschwinden, weist auf die Beteiligung dieser Protonen an Thymin-Adenin-H-Brücken hin. Dies wird durch den Vergleich mit dem unter gleichen Bedingungen aufgenommenen  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von  $\text{ddGlc}(\text{T}_6)$  bestätigt: Dieses Oligonucleotid liegt als Einzelstrang vor [3], und in seinem Spektrum erscheinen die Imid-Protonen als breites Signal um 11,2 ppm (Fig. 17, c). Bei Einstrahlung auf der  $\text{H}_2\text{O}$ -Frequenz werden die Imid-Proton-Resonanzen von  $\text{ddGlc}(\text{T}_6)$  *vollständig* gesättigt, dies im Einklang mit einem schnelleren Austausch der an einer Basenpaarung unbeteiligten Imid-Protonen. Die gegenüber  $\text{ddGlc}(\text{T}_6)$  verrin-

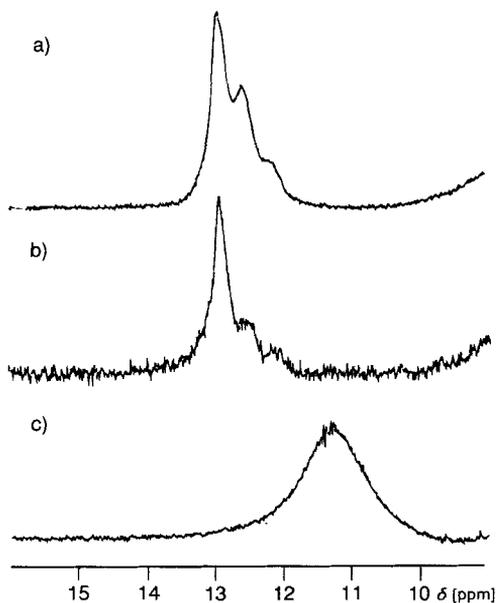


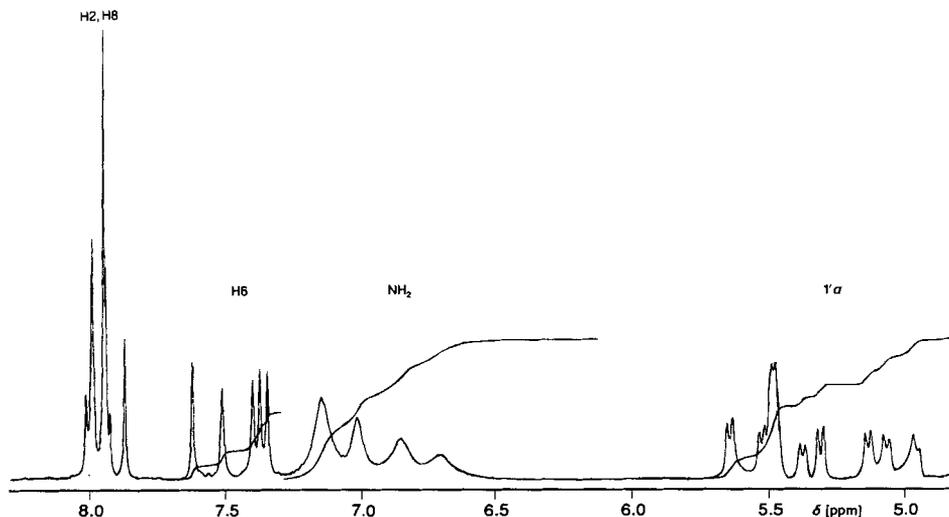
Fig. 17.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Imino-Proton-Region von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  (Fig. 17, a und b) und  $\text{ddGlc}(\text{T}_6)$  (Fig. 17, c) in  $\text{H}_2\text{O}$  (500 MHz, 4°)\*

\*)  $^1\text{H-NMR}$  Signals of imino protons, spectra recorded in  $\text{H}_2\text{O}$  solution at 4°, pH 7.0. a)  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  suppression scheme  $(\pi/2)_x$ (selective) –  $(\pi/2)_x$ (non-selective) detection, carrier frequency at the  $\text{H}_2\text{O}$  resonance. b)  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$ , pre-saturation of  $\text{H}_2\text{O}$  signal. c) Single-strand  $\text{ddGlc}(\text{T}_6)$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  suppression scheme as in a, signal disappears with pre-saturation of  $\text{H}_2\text{O}$  signal, indicating more rapid exchange of the imino protons.

<sup>8)</sup> Bei endständigen Basenpaaren können diese Signale bei höherem Feld (ca. 12,5 ppm) liegen.

gerten Austauschraten der Imid-Protonen von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  ergeben zusammen mit deren Tieffeld-Verschiebung (vgl. *Fig. 17*) einen klaren Hinweis auf die Existenz von Thymin-Adenin-H-Brücken in diesem Homo-DNS-Komplex.

Die Signale der Amino-Protonen der Adenin-Basen in  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  wurden auch bei  $50^\circ$  im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum beobachtet (*Fig. 18*). Wie der Vergleich mit den Integralen der zehn  $\text{H1}'\alpha$ -Signale und der fünf  $\text{H6}$ -Signale der Thymin-Basen zeigte, wurden dabei *sämtliche* Amino-Protonen-Resonanzen beobachtet. Diese Signale ergaben im  $[\text{H},^1\text{H}]$ -NOESY-Spektrum in  $\text{H}_2\text{O}$  starke Kreuzpeaks mit dem Lösungsmittel, die auf raschen Protonenaustausch zurückzuführen sind.



*Fig. 18.*  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  bei  $50^\circ$  zur Beobachtung der  $\text{NH}$ -Proton-Signale (3 mm in Duplex, 50 mM Phosphat-Puffer, 100 mM NaCl, pH 7.0,  $^1\text{H}$ -Frequenz = 500 MHz)\*)

\*)  $^1\text{H-NMR}$  Spectrum of  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.0 and  $50^\circ$ , recorded with scheme described in *a* of summary to *Fig. 17*. According to the integrals of the  $\text{H6}$ ,  $\text{NH}_2$ , and  $\text{H1}'\alpha$  resonances, all labile  $\text{NH}_2$  resonances are observed.

Das Verhalten der Imid-Protonen in  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  wurde auch durch  $^{15}\text{N-NMR}$ -Spektroskopie charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde eine Probe des Oligonucleotids hergestellt, deren  $\text{N}(1)$ - und  $\text{N}(3)$ -Positionen sämtlicher Thymin-Basen zu 99,5% mit  $^{15}\text{N}$  besetzt sind<sup>9)</sup>. *Fig. 19* zeigt das eindimensionale  $^{15}\text{N-NMR}$ -Spektrum dieser Probe bei verschiedenen Temperaturen. Die  $^{15}\text{N}(3)$ -Resonanzen der Thymin-Basen waren bei allen Temperaturen nahezu vollständig entartet. Bei  $10^\circ$  wurde aufgrund der skalaren Kopplung mit dem Imid-Proton ein *Dublett* mit einer scheinbaren  $^1J(^{15}\text{N},^1\text{H})$ -Kopplungskon-

<sup>9)</sup> (1,3- $^{15}\text{N}_2$ )Thymin wurde nach einer literaturbekannten Methode synthetisiert [19]. Dabei wurde 99,5%  $^{15}\text{N}$ -markierter Harnstoff verwendet (*Isotec Inc. A Matheson, USA Comp.*). Die Synthese des  $\text{ddGlc}$ -Nucleosids und Nucleotids verlief analog zu den in [2] beschriebenen Experimenten. Für die  $^{15}\text{N-NMR}$ -Messungen wurde derselbe Phosphat-Puffer verwendet wie bei der nicht-isotopenmarkierten Probe.

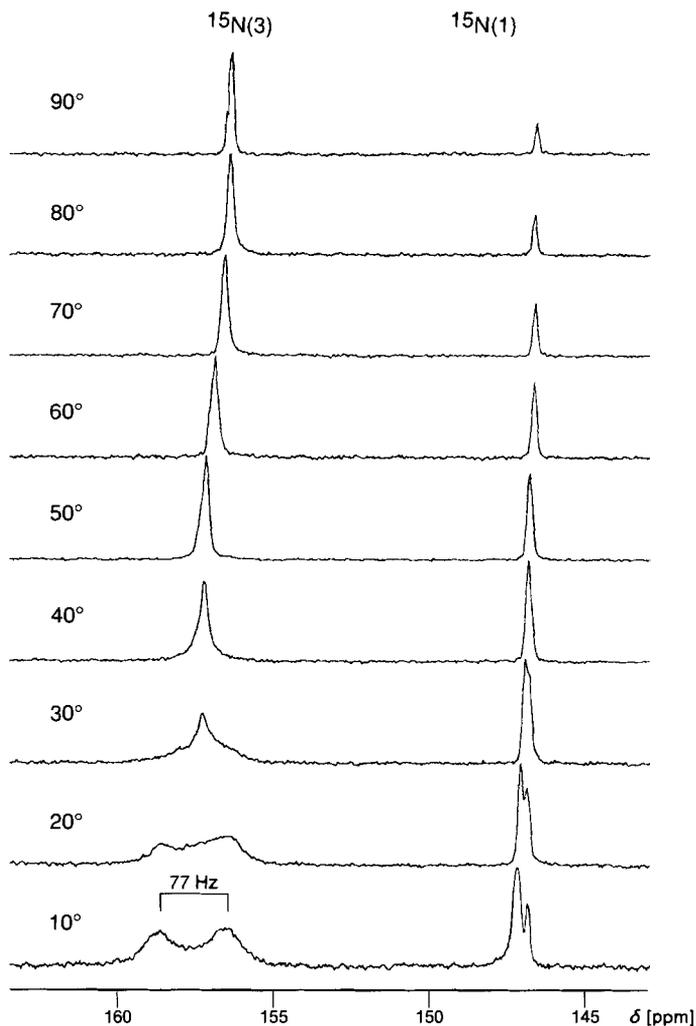


Fig. 19.  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren von  $[\text{ddGlc}(A_5-T_5)]_2$  bei verschiedenen Temperaturen\*)

- \*) 1D- $^{15}\text{N}$ -NMR Spectra of  $[\text{ddGlc}(A_5-T_5)]_2$  in which the N-atoms N(1) and N(3) of all thymine bases are labeled with  $^{15}\text{N}$  (99.5%). The doublet observed at 157.5 ppm at 10° documents the  $^1J(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$  coupling with the imino proton. Its coalescence between 20° and 30° indicates that the lifetime of its exchange with the bulk  $\text{H}_2\text{O}$  is ca. 5 ms at this temperature. This lifetime is much shorter than in adenine-thymine base pairs of natural DNA [8]. Chemical-shift referencing: external liquid  $\text{NH}_3$  [21b].

stanten von ca. 77 Hz beobachtet (ein Kontroll-Experiment mit  $^1\text{H}$ -Entkopplung lieferte unter denselben Bedingungen ein *Singulett*). Im Temperaturbereich zwischen 20° und 30° sind die Austauschraten der Imid-Protonen mit dem Lösungsmittel von vergleichbarer Grössenordnung wie die  $^1J(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -Kopplungskonstante, was zur Koaleszenz der *Dublett*-Feinstruktur führt. Eine genauere Analyse der Linienform [20] lieferte eine unge-

fähre Lebensdauer der Imid-Protonen von 5 ms in diesem Temperaturbereich. Da bekannt ist, dass der Imid-Protonen-Austausch in DNS-Duplexen durch Puffer-Systeme mit Phosphat- und Ammonium-Ionen katalysiert wird [21a], wurde das Austausch-Verhalten des  $^{15}\text{N}$ -markierten  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  auch in salzfreien Lösungen bei analogem pH-Wert untersucht. Im  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum der salzfreien Probe trat die Koaleszenz des *Dubletts* der Imid-N-Atome im Vergleich zum Messexperiment in dem sonst verwendeten NaCl-Phosphat-Puffer bei einer um *ca.*  $20^\circ$  höheren Temperatur ein. Die dieser Beobachtung entsprechende Stabilisierung der Imid-Protonen kommt auch in der im Vergleich zum in der Puffer-Lösung gemessenen Wert von 77 Hz (vgl. oben) grösseren scheinbaren  $^1J(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ -Kopplungskonstanten von 87 Hz (gemessen bei  $20^\circ$ ) zum Ausdruck. Die Imid-Protonen der (salzfreien)  $^{15}\text{N}$ -markierten Probe wurden im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bei  $50^\circ$  als ein *ca.* 250-Hz-breites Signal bei 12,21 ppm beobachtet. Verglichen mit den Adenin-Thymin-Basenpaaren in natürlicher DNS sind die Austauschraten der Imid-Protonen in  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  also auch in salzfreien Lösungen immer noch um ein bis zwei Grössenordnungen schneller [21a].

Die  $^{15}\text{N}(3)$ -chemischen Verschiebungen im  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum der  $^{15}\text{N}$ -markierten Probe von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  zeigten die in Fig. 20 wiedergegebene sigmoidale Abhängigkeit von der Temperatur. Der Wendepunkt der Schmelzkurve bei *ca.*  $60^\circ$  entspricht der bei dieser Konzentration zu erwartenden Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Doppelstrangs. Die

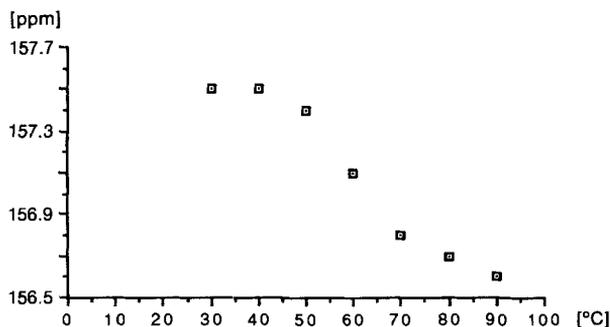


Fig. 20. Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung der  $^{15}\text{N}(3)$ -Resonanzen in  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-}(1,3\text{-}^{15}\text{N}_2)\text{T}_5)]_2$ \*)

\*)  $^{15}\text{N}$  Chemical shifts of Fig. 19 plotted vs. temperature. The shift of the  $^{15}\text{N}(3)$  resonances towards higher field with higher temperature is compatible with H-bond breaking, and the sigmoidal shape of the denaturation curve indicates cooperative melting around  $60^\circ$ .

unterschiedliche  $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebung der N(3)-Kerne im gepaarten und im denaturierten Zustand ist Ausdruck der Veränderung der chemischen Umgebung der Imid-Protonen bei der Denaturierung des Doppelstranges.

Die vorgehend beschriebenen  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -NMR-spektroskopischen Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Imino-Protonen der Thymin-Basen in  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  zwar in einer Basenpaar-H-Verbrückung einbezogen sind, durch diese jedoch weniger gut gegen den Austausch mit Lösungsmittel-Protonen geschützt werden als die Imid-Protonen in

natürlichen DNS-Doppelsträngen. Dieser Befund wurde durch einen direkten Vergleich von  $[d(A_5-T_5)]_2$  und  $[ddGlc(A_5-T_5)]_2$  bestätigt, indem die Signal-Intensitäten der Imino-Protonen in 1D- $^1H$ -NMR-Spektren mit und ohne  $H_2O$ -Sättigung verglichen wurden. Die unter gewissen Bedingungen beobachtete Verbreiterung der Imino-Protonen-Resonanzlinien ist auf den Austausch mit dem Lösungsmittel zurückzuführen und nicht etwa auf die im *Abschn. 4.2* diskutierten Konformation-Gleichgewichte; dies ist besonders deutlich belegt durch die Beobachtung, dass bei Temperatur-Erniedrigung die Imino-Proton-Signale schmaler wurden, obschon die Resonanz-Signale der an C gebundenen H-Atome verbreitert waren.

3.4. *Konformation des Oligonucleotid-Rückgrats im  $[ddGlc(A_5-T_5)]_2$ -Duplex.* Die aufgrund der dreifach äquatorialen Anordnung der drei Substituenten zu erwartende Sessel-

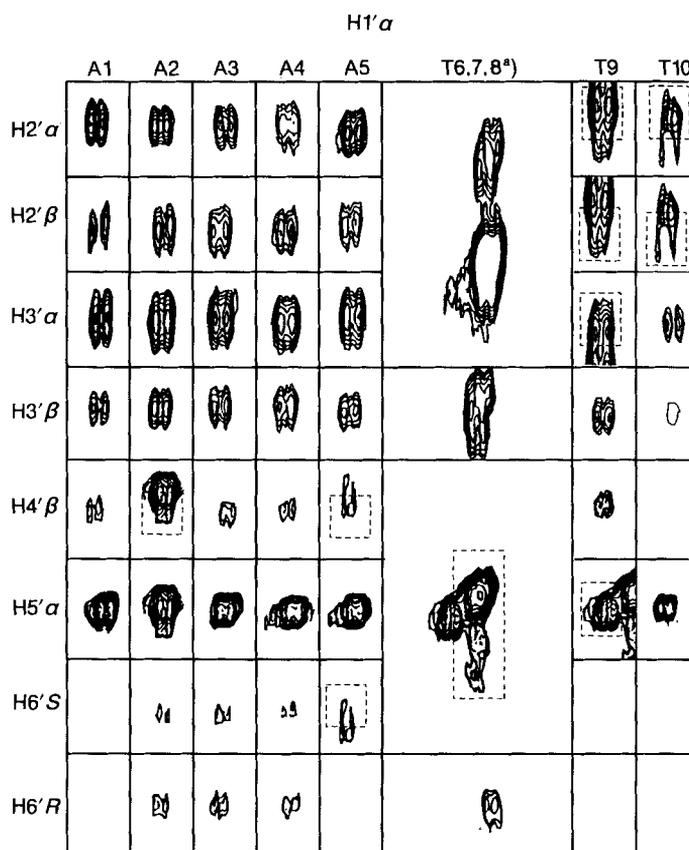


Fig. 21. Relative Intensitäten intranucleosidischer NOE-Kreuzpeaks zwischen H1' $\alpha$  und den übrigen Zucker-Protonen<sup>\*)</sup>

\*) Relative intensities of cross peaks from the  $[^1H,^1H]$ -NOESY spectrum of Fig. 11 corresponding to intra-nucleotide NOEs between H1' $\alpha$  and the other sugar protons. Horizontal axis: individual nucleotides; vertical axis: individual sugar protons. The pattern of relative NOE intensities confirms the chair conformation of the pyranose rings (see Scheme 1). <sup>a)</sup> Uninterpretable cross peak intensities due to spectral overlap.

Konformation der Pyranose-Ringe (*Schema 1*) wurde sowohl durch die aus dem COSY-Spektrum abgeschätzten  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$ -Kopplungskonstanten als auch durch die relativen Intensitäten der NOEs zwischen den Protonen innerhalb der Pyranose-Ringe voll bestätigt. Die qualitative Abschätzung der Kopplungskonstanten aus dem [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-COSY-Spektrum wurde dadurch erleichtert, dass vorausgesetzt werden konnte, dass die aus gut aufgelösten, 1D- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren monomerer Dideoxypyranose-Nucleoside bekannten *geminalen* Kopplungskonstanten dieselbe Grössenordnung aufweisen (10–12 Hz) wie diejenigen der *diaxial-vicinalen* Kopplungskonstanten  $^3J(^1\text{H}1'\alpha, ^1\text{H}2'\beta)$  (*Fig. 5*),  $^3J(^1\text{H}2'\beta, ^1\text{H}3'\alpha)$  (*Fig. 6*),  $^3J(^1\text{H}3'\alpha, ^1\text{H}4'\beta)$  (*Fig. 7*) und  $^3J(^1\text{H}4'\beta, ^1\text{H}5'\alpha)$  (*Fig. 8, a*), während alle anderen vicinalen Kopplungskonstanten kleiner sind als 5 Hz. Die Intensitäten der NOE-Signale in den Ausschnitten A und C des NOESY-Spektrums (*Fig. 11*) spiegeln die konfigurative Lage der Ring-Protonen wider, wie sie in *Schema 1* eingezeichnet sind. Das axiale  $\text{H}1'\alpha$ -Proton zeigt einen stärkeren NOE mit dem äquatorialen  $\text{H}2'\alpha$ -Proton als mit dem antiperiplanar liegenden, axialen  $\text{H}2'\beta$ -Proton, das axiale  $\text{H}3'\alpha$ -Proton zeigt stärkere NOEs mit den axialen  $\text{H}1'\alpha$ - und  $\text{H}5'\alpha$ -Protonen als mit dem äquatorial stehenden, geminalen  $\text{H}3'\beta$ -Proton, und die NOEs zwischen  $\text{H}1'\alpha$  und  $\text{H}4'\beta$  weisen eine verschwindend kleine Intensität auf (vgl. die in *Fig. 21* tabellarisch zusammengestellten NOE-Signale). Die NOEs der  $\text{H}1'\alpha$ -Protonen zu den  $\text{H}4'\beta$ - und  $\text{H}6'R(S)$ -Protonen kommen durch Spin-Diffusion zustande und waren im NOESY-Spektrum mit 40 ms Mischzeit nicht zu beobachten.

Von den sechs Torsionswinkeln  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\zeta$ , die das Oligonucleotid-Rückgrat definieren (*Schema 1*), können  $\gamma$  und  $\delta$  durch  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$ , sowie  $\beta$  und  $\epsilon$  durch  $^3J(^{31}\text{P}, ^1\text{H})$  erfasst werden. Ein für die Konformationsanalyse des Rückgrates erschwerender Umstand ist der, dass die Signale der betroffenen Protonen in der von starker Signalüberlagerung gekennzeichneten Region um 4 ppm (vgl. *Fig. 1*) liegen.

Die Werte für  $^3J(^{31}\text{P}, ^1\text{H}6'R(S))$ , die über den Torsionswinkel  $\beta$  Auskunft geben [22], wurden dem ohne  $^{31}\text{P}$ -Entkopplung aufgenommenen [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-2QF-COSY-Spektrum entnommen. In diesem Spektrum ist jeder der ( $\text{H}6'S \rightarrow \text{H}6'R$ )-Kreuzpeaks<sup>7</sup>) in Bezug auf die ( $^{31}\text{P}, ^1\text{H}$ )-Kopplungen 'unvollständig'. Die resultierenden Kreuzpeaks erscheinen als jeweils zwei identische, rechteckige *Multipllett*-Muster, die in beiden Dimensionen um den Betrag der  $^3J(^{31}\text{P}, ^1\text{H})$ -Kopplungskonstanten gegeneinander verschoben sind [16a]. Das Verfahren zur Ermittlung der ( $^{31}\text{P}, ^1\text{H}$ )-Kopplungskonstanten ist in *Fig. 22* am Beispiel der ( $\text{H}6'R \rightarrow \text{H}6'S$ )-Kreuzpeaks von T10 illustriert. Es resultieren sowohl für  $^3J(^{31}\text{P}, ^1\text{H}6'R)$ , als auch für  $^3J(^{31}\text{P}, ^1\text{H}6'S)$  kleine Werte von ca. 5 Hz, und aus der *Karplus*-Kurve für  $^3J(^{31}\text{P}, ^1\text{H})$  [22] ergeben sich hieraus Werte um  $180^\circ$  für den Torsionswinkel  $\beta$ . Eine Ausnahme bildet das  $\text{H}6'S$ -Proton<sup>7</sup>) des Nucleotids T6, welches im Übergang vom  $\text{A}_5$ - in das  $\text{T}_5$ -Segment liegt. Seine Kopplungskonstanten  $^3J(^{31}\text{P}, ^1\text{H}6'S)$  und  $^3J(^{31}\text{P}, ^1\text{H}6'R)$  betragen ca. 10 Hz bzw. 5 Hz, was gemäss der *Karplus*-Kurve einem Wert für  $\beta$  (T6) von ca.  $-130^\circ$  entsprechen würde.

Der Torsionswinkel  $\gamma$  ist durch die Kopplungskonstanten  $^3J(^1\text{H}6'R, ^1\text{H}5'\alpha)$  und  $^3J(^1\text{H}6'S, ^1\text{H}5'\alpha)$  erfassbar. Die Peak-Intensität der entsprechenden COSY-Kreuzpeaks (*Fig. 8, b*) ist klein und auch die *Multipllett*-Muster weisen darauf hin, dass beide Kopplungskonstanten klein sind im Vergleich zu den geminalen Kopplungskonstanten  $^2J(^1\text{H}6'R, ^1\text{H}6'S)$ . Um eine Analyse möglichst vieler ( $\text{H}6'R(S) \rightarrow \text{H}5'\alpha$ )-Kreuzpeaks zu ermöglichen, wurde ein  $^{31}\text{P}$ -entkoppeltes [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-3QF-COSY-Spektrum aufgenommen, aus dem die ( $\text{H}4'\beta \rightarrow \text{H}5'\alpha$ )-Kreuzpeaks weggefiltert sind (*Fig. 23*) [16b]. Die

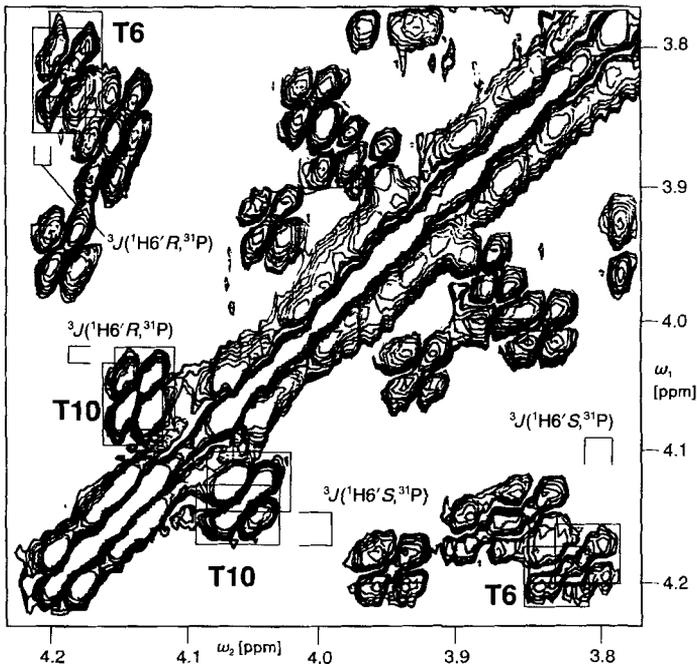


Fig. 22. Ausschnitt aus einem  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -2QF-COSY-Spektrum (600 MHz,  $50^\circ$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  ohne  $^{31}\text{P}$ -Entkopplung zur Identifikation der  $(\text{H}6'\text{R} \rightarrow \text{H}6'\text{S})$ -Kreuzpeaks der Nucleotide A2–5 und T6–10. Für T10 ist die Feinstruktur-Interpretation eingezeichnet (s. Text)\*).

\*) Spectral region from a  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -2QF-COSY spectrum recorded without  $^{31}\text{P}$  decoupling showing  $\text{H}6'\text{R} \rightarrow \text{H}6'\text{S}$  cross peaks. The  $^3J(^{31}\text{P}, ^1\text{H})$  couplings with both  $\text{CH}_2(6')$  protons result in incomplete COSY cross-peak patterns of  $\text{H}6'\text{R} \rightarrow \text{H}6'\text{S}$  cross peaks [16]. The measurement of the  $^3J(^1\text{H}6'\text{R}, ^{31}\text{P})$  and  $^3J(^1\text{H}6'\text{S}, ^{31}\text{P})$  coupling constants is illustrated by the cross peaks of T10; rectangles identify the two residual rectangular COSY cross-peak patterns originating from the homonuclear  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  couplings.

$(\text{H}6'\text{S} \rightarrow \text{H}5'\alpha)$ - und  $(\text{H}6'\text{R} \rightarrow \text{H}5'\alpha)$ -Kreuzpeaks besitzen in diesem Experiment identische *Multiplett*-Strukturen in der  $\omega_2$ -Dimension, so dass ein beliebiger Querschnitt durch einen der beiden Kreuzpeaks zur Analyse der Kopplungskonstanten herangezogen werden kann. *Schema 6* zeigt den schematischen Aufbau des  $\text{H}5'\alpha$ -*Multipletts* in den  $(\text{H}6'\text{R}(\text{S}) \rightarrow \text{H}5'\alpha)$ -Kreuzpeaks. Die homonuclearen Kopplungen von  $\text{H}5'\alpha$  mit  $\text{H}4'\beta$ ,  $\text{H}6'\text{R}$  und  $\text{H}6'\text{S}$  führen zu acht Linien im  $\text{H}5'\alpha$ -*Multiplett* der  $(\text{H}6' \rightarrow \text{H}5'\alpha)$ -Kreuzpeaks, wobei die Kopplungen mit den  $\text{H}6'$ -Protonen zu Antiphase-Aufspaltungen führen und die Kopplung mit dem  $\text{H}4'\beta$ -Proton eine Inphase-Aufspaltung ergibt. Bei der in den Spektren von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  vorliegenden Linienbreite wird somit nur dann negative Signal-Intensität im Zentrum des *Multipletts* erwartet, wenn die Kopplungskonstante  $^3J(\text{H}4'\beta, \text{H}5'\alpha)$  deutlich grösser ist als die beiden anderen Kopplungskonstanten  $^3J(\text{H}5'\alpha, \text{H}6'\text{R}(\text{S}))$ . Im 3QF-COSY-Spektrum von Fig. 23 wird diese negative Signal-Komponente mit Ausnahme von T6–T8 in allen  $\text{H}5'\alpha$ -*Multipletts* gefunden. Die Kreuzpeaks der Nucleotide T6–T8 sind für eine eindeutige Bestimmung der *Multiplett*-Struktur nicht

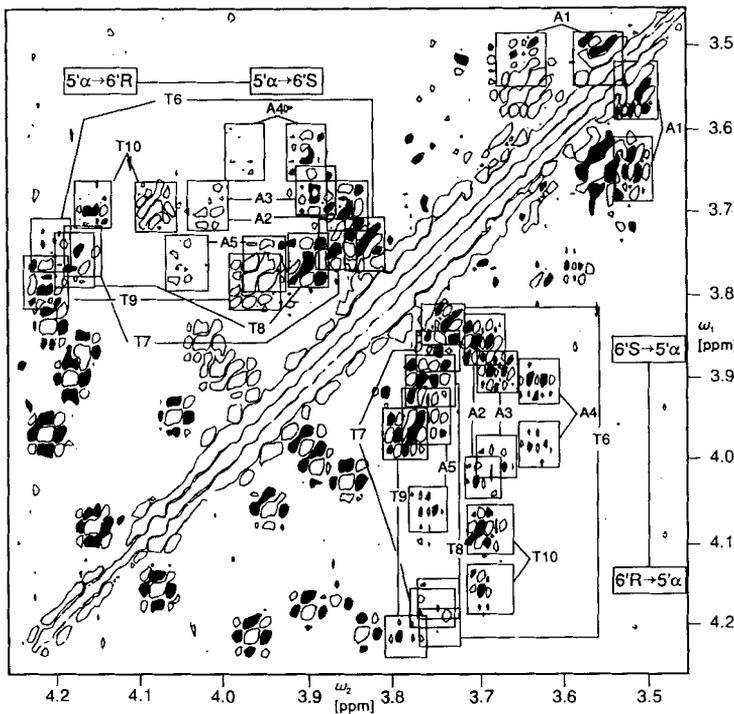


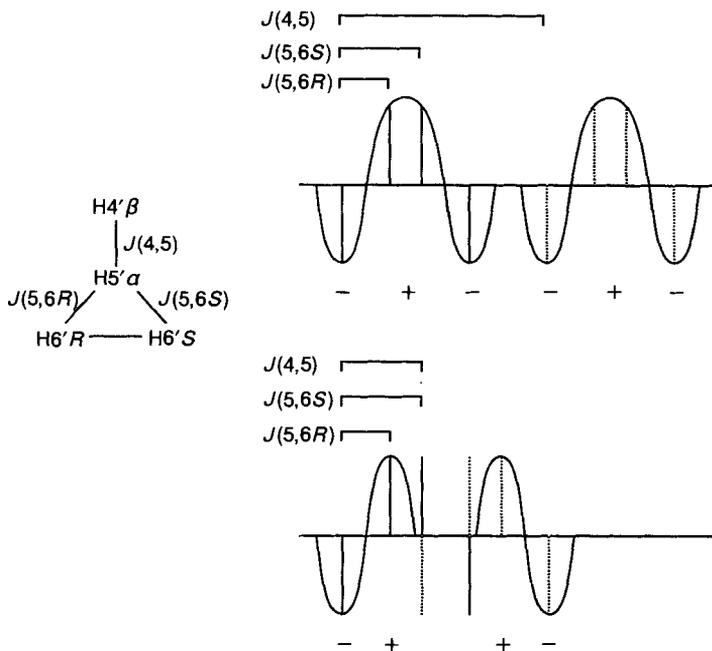
Fig. 23. Ausschnitt aus einem  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -3QF-COSY-Spektrum (600 MHz, 50°, D<sub>2</sub>O) von  $[\text{ddGlc}(A_5\text{-}T_5)]_2$  mit  $^{31}\text{P}$ -Entkopplung\*)

\*) Spectral region ( $\omega_1 = 3.45\text{--}4.25$  ppm,  $\omega_2 = 3.45\text{--}4.25$  ppm) from a  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -3QF-COSY spectrum with  $^{31}\text{P}$  decoupling applied throughout the experiment. Identical *multiplet* fine structures are observed for the  $\text{H}5'\alpha$  resonance in the  $\text{H}6'\text{R} \rightarrow \text{H}5'\alpha$  and  $\text{H}6'\text{S} \rightarrow \text{H}5'\alpha$  cross peaks below the diagonal. The analysis of the cross sections along the  $\omega_2$  axis according to *Scheme 6* shows that the couplings of  $\text{H}5'\alpha$  with  $\text{H}6'\text{R}$  and  $\text{H}6'\text{S}$  are smaller than  $^3J(\text{H}4'\beta, \text{H}5'\alpha)$ , indicating a value of ca.  $+60^\circ$  for the torsion angle  $\gamma$  (*Scheme 1*). In the antiphase *multiplets*, positive peaks are black, negative peaks in single contour lines.

genügend gut aufgelöst; weiter sind die  $\text{H}5'\alpha$ - und  $\text{H}4'\beta$ -Resonanzen für diese Nucleotide nahezu entartet, so dass Effekte starker Kopplung das *Multiplett*-Muster beeinflussen. Insgesamt zeigen die Kopplungsmuster der  $\text{H}5'\alpha$ -Protonen, dass die  $\text{H}6'\text{R}$ - und  $\text{H}6'\text{S}$ -Protonen nicht wie die  $\text{H}4'\beta$ -Protonen antiperiplanar zu den  $\text{H}5'\alpha$ -Protonen angeordnet sein können. Die einzige (gestaffelte) Konformation, die diese Bedingung erfüllt, verlangt Werte um  $+60^\circ$  für die Torsionswinkel  $\gamma$ .

Für die Torsionswinkel  $\delta$  der endocyclischen Rückgrat-Bindungen bedingt die Sessel-Konformation des Pyranose-Rings (*Abschn. 3.4*) Werte um  $+60^\circ$ .

Der Torsionswinkel  $\varepsilon$  wurde aus dem Vergleich der Gesamtbreiten der  $\text{H}4'\beta$ -*Multipletts* in den  $(\text{H}3'\alpha, \beta \rightarrow \text{H}4'\beta)$ -Kreuzpeaks (vgl. 2QF-COSY, *Fig. 7*) von zwei  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -COSY-Spektren bestimmt, die mit bzw. ohne  $^{31}\text{P}$ -Entkopplung während der Detektionsperiode gemessen wurden (*Fig. 24*). Die so ermittelten  $^3J(^{31}\text{P}, ^1\text{H}4'\beta)$ -Kopplungskonstan-

Schema 6. Multiplett-Analyse der H5'α-Resonanzen in den Kreuzpeaks des [<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H]-3QF-COSY-Spektrums\*)

- \*) Analysis of the *multiplet* fine structures of the H5'α resonances in the H6'R(S)→H5'α cross peaks in the 3QF-COSY spectrum of Fig. 23. The H5'α *multiplet* shows a large in-phase splitting, due to the coupling with the H4'β proton, and two antiphase splittings due to the couplings with the H6'R and H6'S protons, resulting in a *multiplet* with eight components. The curves represent the intensity profiles obtained by broadening of each of the lines in the two individual *multiplet* substructures which result from the passive <sup>3</sup>J(H4'β, H5'α) coupling. While negative signal intensity prevails in the center of the entire *multiplet*, when this coupling constant is large (upper part of the drawing), no negative signal intensity is observable in the center of the *multiplet* for <sup>3</sup>J(H4'β, H5'α) couplings which are equal to or smaller than either of the two <sup>3</sup>J(H5'α, H6'R(S)) couplings (lower part of the drawing).

ten weisen Werte zwischen 2 und 4 Hz auf. Dies entspricht Torsionswinkel-Werten für  $\epsilon$  um  $+60^\circ$  oder um  $180^\circ$ , wobei der Wert  $\epsilon = +60^\circ$  aus sterischen Gründen ausgeschlossen werden kann (1,5 Repulsion zwischen Phosphat-Gruppe und exocyclischer CH<sub>2</sub>(6')-Gruppe).

Eine weitere Möglichkeit zur Erfassung der Torsionswinkel  $\epsilon$  und  $\beta$  sind die Kopplungskonstanten <sup>3</sup>J(<sup>31</sup>P, <sup>13</sup>C3') bzw. <sup>3</sup>J(<sup>31</sup>P, <sup>13</sup>C5'). Eine genauere Betrachtung der [<sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H]-COSY-Signale (Fig. 10) zeigt, dass die <sup>13</sup>C-Signale der C(5')-Atome entlang  $\omega_1$  breiter sind als die <sup>13</sup>C-Signale der C(4')- und C(6')-Atome. Dies stimmt mit dem Vorliegen einer *trans*-Kopplung <sup>3</sup>J(<sup>31</sup>P, <sup>13</sup>C5') überein, für die eine Kopplungskonstante von ca. 10 Hz erwartet wird [22]<sup>10</sup>). Im Gegensatz zu C(5') wurde für die C(3')-Resonanzen im [<sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H]-COSY-Spektrum keine Signal-Verbreiterung gefunden (nicht abgebildet), wie dies bei

<sup>10</sup>) Die <sup>13</sup>C-Signale der C-Atome C(4') und C(6') werden durch <sup>2</sup>J(<sup>31</sup>P, <sup>13</sup>C) um nur ca. 6 Hz verbreitert [6].

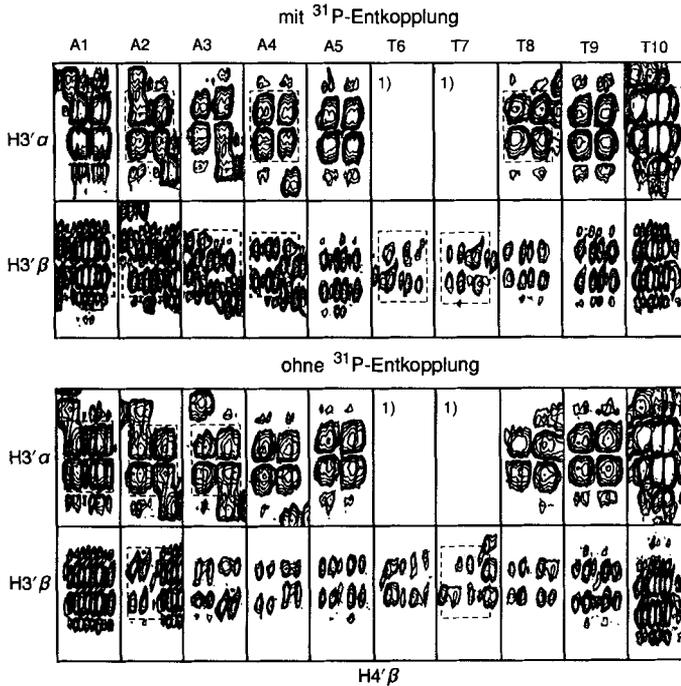


Fig. 24. ( $H3'\alpha \rightarrow H4'\beta$ )- und ( $H3'\beta \rightarrow H4'\beta$ )-Kreuzpeaks aus einem [ $^1H, ^1H$ ]-2QF-COSY-Spektrum (600 MHz, 50°,  $D_2O$ ) von  $[ddGlc(A_5-T_5)]_2$  mit und ohne  $^{31}P$ -Entkopplung\*)

\*) Overview of the  $H3'\alpha \rightarrow H4'\beta$  and the  $H3'\beta \rightarrow H4'\beta$  cross peaks recorded in two identical [ $^1H, ^1H$ ]-COSY experiments except that  $^{31}P$  decoupling during the detection period was used only in the experiments shown in the upper part. The comparison of the  $H4'\beta$  linewidths in the  $\omega_2$  dimension (horizontal axis) between the two experiments yields an estimate for  $^3J(^{31}P, ^1H4'\beta)$ . In the present case, all these couplings were small, in agreement with  $\epsilon \approx 180^\circ$  (Scheme 1). <sup>a</sup>) Cross peaks obscured by spectral overlap.

Werten um  $180^\circ$  für den Torsionswinkel  $\epsilon$  (und damit um  $+60^\circ$  für  $P-O-C(4')-C(3')$ , vgl. *Scheme 1*) zu erwarten ist<sup>11)</sup>. Der aufgrund der  $^3J(^{31}P, ^1H4'\beta)$ -Kopplungskonstanten ebenfalls mögliche Wert für  $\epsilon \approx +60^\circ$  kann damit auch mit NMR-spektroskopischen (und nicht nur sterischen, vgl. oben) Argumenten ausgeschlossen werden.

3.5. *Konformation der Basenverknüpfung.* Die intranucleotidischen NOEs der Basen-Protonen H6 (Thymin) und H8 (Adenin) mit den Pyranose-Ring-Protonen  $H1'\alpha$ ,  $H2'\alpha, \beta$ ,  $H3'\alpha, \beta$ ,  $H4'\beta$ ,  $H5'\alpha$  wurden bereits in *Abschn. 3.1* erörtert (*Fig. 14*). In *Fig. 25* sind die für die Ermittlung des Torsionswinkels  $\chi$  (*Scheme 1*) relevanten Kreuzpeaks des NOESY-Spektrums, das mit 40-ms-Mischzeit aufgenommen wurde, tabellarisch zusammengestellt; dabei sind die Signale mit einer exponentiellen Skala wiedergegeben, in der jede Höhenlinie um den Faktor  $\sqrt{2}$  höher liegt als die vorangehende. Die  $H2'\beta$ -Protonen zeigen im Vergleich zu den  $H1'\alpha$ - und  $H2'\alpha$ -Protonen eindeutig die intensivsten NOEs

<sup>11)</sup> Die Karplus-Gleichung gibt für Dihedral-Winkel von  $+60^\circ$  Kopplungskonstanten  $^3J(^{31}P, ^{13}C) = 0,5$  Hz an [22].

mit den Basen-Protonen. Diese Art des Intensitätsverhältnisses wird für den Fall erwartet, dass die Basenverknüpfung konformationell dem *anti*-Typ (Torsionswinkel  $\chi$  im Bereich  $-60^\circ$  bis  $-180^\circ$ ) angehört [8]; würde der *syn*-Konformationstyp ( $\chi$  im Bereich  $0^\circ$  bis  $+120^\circ$ ) vorliegen, müsste von den drei in Fig. 25 gezeigten NOEs mit den Basen-Protonen H8 bzw. H6 jener mit dem Anomer-Proton H1' $\alpha$  der intensivste sein (vgl. Schema 7).

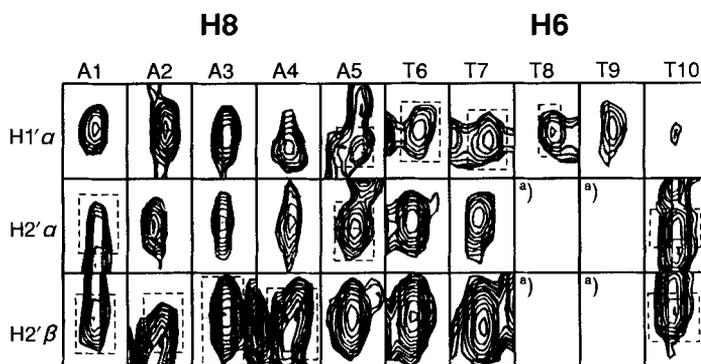
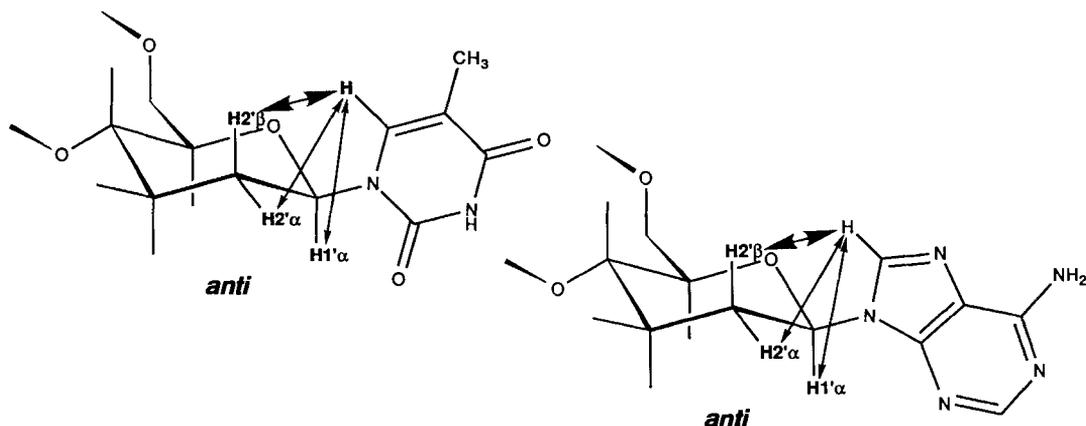


Fig. 25. Intranucleosidische NOESY-Kreuzpeaks zwischen den Basenprotonen H8 (A) oder H6 (T) (horizontale Achse) und den Pyranose-Ring-Protonen H1' $\alpha$ , H2' $\alpha$  und H2' $\beta$  (vertikale Achse)\*)

\*) Overview of the intranucleotide NOESY cross peaks between the sugar protons H1' $\alpha$ , H2' $\alpha$ , and H2' $\beta$  (columns) and the H8 or H6 base protons (rows) from a [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ]-NOESY spectrum recorded with 40-ms mixing time. The relative NOE intensities confirm the *anti*-conformation about the sugar-base bond (Scheme 7) and rule out the *syn*-conformation. <sup>a)</sup> Cross peaks obscured by spectral overlap.

Schema 7. Relative Intensitäten intranucleosidischer NOEs zwischen Basen- und Zucker-Protonen\*)

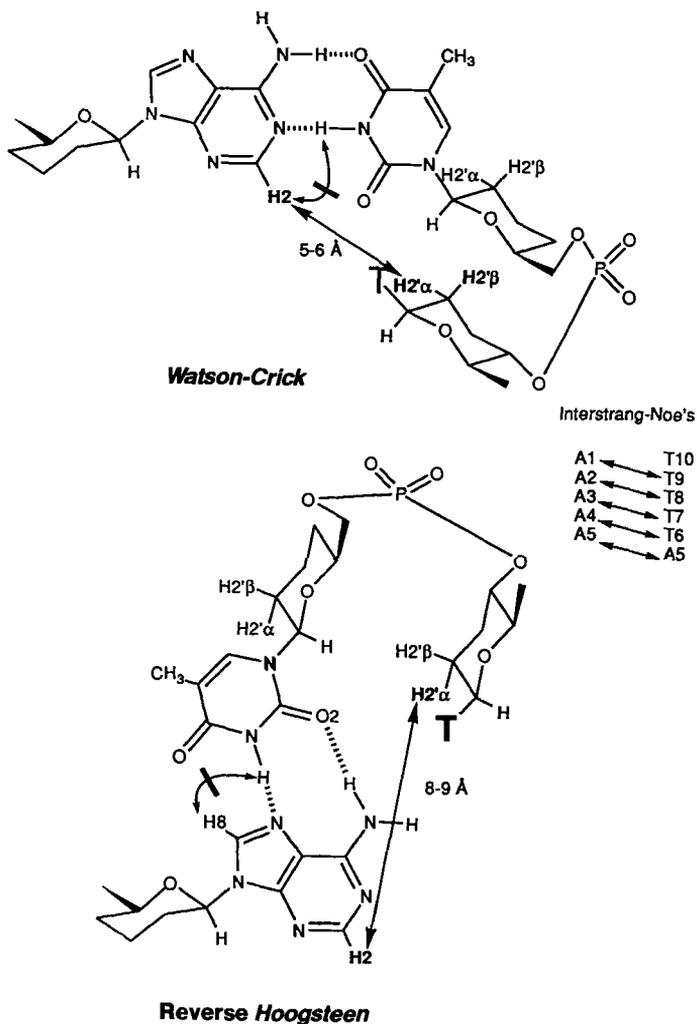


\*) In the *anti*-conformation of the base (adenine-H2 and thymine-H6 *anti* to H1' $\alpha$  of the pyranose ring), the adenine proton H8 and the thymine proton H6 show stronger NOEs with the H2' $\beta$  proton than with H2' $\alpha$  and H1' $\alpha$  (Fig. 25). In the *syn*-conformation (not shown) the strongest NOE would be with H1' $\alpha$ .

**4. Strukturmodelle.** – 4.1 *Paarungsmodus.* Der Befund, wonach infolge des raschen Austausches der Thymin-NH-Protonen von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$  mit den Protonen des wässrigen Lösungsmittels keine NOEs mit diesen NH-Protonen beobachtbar sind, bedeutet eine schwerwiegende Einschränkung der Möglichkeiten NMR-spektroskopischer Strukturermittlung von Adenin- und Thymin-haltigen Paarungskomplexen in der HomodNS-Reihe. Es entfällt damit nämlich die Möglichkeit der direkten Beobachtung des konstitutionellen Modus der (Adenin-Thymin)-Paarung durch paarungsspezifische NOEs, die in der DNS-Reihe auf einfache und schlüssige Weise sowohl den Nachweis der Basenpaarung an sich, als auch die Zuordnung des Paarungsmodus ermöglichen. Dies beruht auf der Beobachtung von intensiven NOEs zwischen den H2-Protonen der Adenin-Basen und den NH-Protonen der Thymin-Basen bei einer normalen *Watson-Crick*-Paarung, bzw. von NOEs zwischen den H8-Adenin-Protonen und den Thymin-NH-Protonen im Falle einer Paarung des *Hoogsteen*-Typs [8].

NOEs mit Thymin-NH-Protonen in NOESY-Spektren von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  sind nicht nur bei  $50^\circ$  nicht beobachtbar (kein NH-Protonensignal infolge zu raschen Austausches), sondern auch bei Raumtemperatur und bei  $4^\circ$  nicht, weil bei diesen tiefen Temperaturen alle  $^1\text{H}$ -NMR-Signale zu stark verbreitert sind. Obschon deshalb der Paarungsmodus in  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$  NMR-spektroskopisch nicht ebenso direkt wie in der DNS-Reihe ermittelt werden konnte, ergab sich durch Kombination der vorgehend beschriebenen NMR-Daten aufgrund der nachstehenden Überlegungen eine eindeutige Folgerung.

Für alle Nucleotid-Einheiten von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$  wurden sehr ähnliche NOEs, Kopplungskonstanten und chemische Verschiebungswerte gefunden; dies weist auf eine konformationell repetitive Anordnung der Basenpaare und einen einheitlichen Paarungstyp hin. Unter den insgesamt vier konstitutionellen Varianten, welche aus chemischen Gründen als Modus einer (Adenin-Thymin)-Paarung in Frage kommen (vgl. Schema 6 im Teil III dieser Reihe [3]), sind in  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$  aufgrund der antiparallelen Strang-Orientierung sowie der *anti*-Konformation der Basenverknüpfung nur deren zwei in Betracht zu ziehen, nämlich die *Watson-Crick*- und die *reverse-Hoogsteen*-Paarung (Schema 8). Aufgrund der vorhandenen NMR-Daten kann die *reverse-Hoogsteen*-Paarung ausgeschlossen werden, weil in  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$  intensive NOEs zwischen den H2-Protonen der Adenin-Basen und den H2' $\alpha$ -Protonen der sequentiell nachfolgenden Thymin-Nucleotid-Einheiten im Partnerstrang beobachtet wurden (vgl. Abschn. 3.3 und Schema 5). In (idealisierten)  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$ -Modellen mit *Watson-Crick*-Paarung liegen diese Protonen um 5–6 Å auseinander und in entsprechenden Modellen mit *reverse-Hoogsteen*-Paarung um 8–9 Å. Diese Distanzen sind auch nur wenig abhängig davon, ob man den Phosphodiester-Gruppierungen den bis-synclinalen (*-sc/-sc*), oder den synclinal-anti-periplanaren (*ap/-sc*) Konformationstyp zuordnet (Schema 8). Die Verkürzung dieses Abstandes auf Werte von weniger als 5 Å lässt sich im *Watson-Crick*-Modell (durch Abweichung von Torsionswinkeln von ihrem Idealwert) leicht bewerkstelligen, nicht aber im *reverse-Hoogsteen*-Modell, wo der Protonenabstand für eine NOE-Beobachtung prohibitiv lang erscheint. Diese indirekte NMR-spektroskopische Festlegung auf den *Watson-Crick*-Modus in  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$  wird auch durch im Teil III dieser Reihe erörterte chemische Argumente zugunsten der (A/T)-*Watson-Crick*-Paarung unterstützt (vgl. Abschn. 3.1.1 in [3]).

Schema 8. Zuordnung des Paarungsmodus in  $[ddGlc(A_5-T_5)]_2$  aufgrund von Interstrang-NOEs\*)

\*) Adenine-thymine pairing with antiparallel strand orientation is formally compatible with either the *Watson-Crick* or the *reverse-Hoogsteen* pairing mode [3]. In the DNA series, the pairing mode is NMR spectroscopically determined in  $H_2O$  as solvent by observing NOEs between the thymine imino proton and either the adenine-H2 (in case of the *Watson-Crick* mode) or the adenine-H8 (in case of the *Hoogsteen* or *reverse-Hoogsteen* mode). Here, in the homo-DNA series, no NOE including the thymine imino proton can be detected because of its much faster exchange with  $H_2O$ . The pairing mode in  $[ddGlc(A_5-T_5)]_2$  is NMR spectroscopically deduced from the observation of intense interstrand NOEs between the adenine-H2 protons and the pyranose-H2'α protons of the sequentially succeeding thymidine nucleotide unit in the opposite strand (Fig. 16 and Scheme 5). This interstrand NOE discriminates between the two pairing modes in favor of the *Watson-Crick* mode; in case of a *reverse-Hoogsteen* pairing the distance between the NOE partners H2 and H2'α would be prohibitively long (ca. 8 Å).

4.2. *Computerunterstützte Ableitung von Struktur-Modellen.* Zur Konstruktion von NMR-kompatiblen Struktur-Modellen für  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$  diente das Computerprogramm CONFOR [23]. Für den Zucker-Teil wurde von Kristallstruktur-Daten des 2',3'-Dideoxy-D- $\beta$ -glucopyranosyl-adenins [2] und für die beiden Basen sowie die Phosphodiester-Gruppierung von früher verwendeten Struktur-Daten [7] ausgegangen. Als Einstiegsmodell diente das mit Hilfe der qualitativen Konformationsanalyse abgeleitete (idealisierte) Modell des linearen Homo-DNS-Einzelstrangs [1] (vgl. *Schema 1*), in welchem die konstitutionell repetitiven Nucleotid-Einheiten auch konformationell repetitiv sind und dementsprechend durch einfache Translationen entlang der Strang-Achse ineinander übergeführt werden können. Der aus diesem Vorgehen resultierende lineare Einzelstrang wurde kopiert, und die beiden identischen Einzelstränge *empirisch*, d. h. durch interaktive Manipulation im Rahmen des Programms CONFOR, zu einem Doppelstrang mit *Watson-Crick*-Paarung und antiparalleler Strang-Orientierung zusammengepasst. Entsprechend der Diskussion im Teil III dieser Reihe [3] (vgl. dort Fig. 31) gibt es für lineare und gleichzeitig dreidimensional-chirale Einzelstränge die Paarungseinschränkung, dass gepaarte Doppelstränge solch (idealisiert) linearer Einzelstränge nicht strikte linear sein können. Deshalb erfordert hier dieses gegenseitige Aneinanderpassen der beiden Stränge *a priori* eine Anpassung der Rückgrat-Torsionswinkel  $\alpha$  bis  $\xi$  durch Abweichungen von den Standardwerten in den linearen Einzelsträngen, vor allem auch eine paarungsgerechte Einstellung des Torsionswinkels  $\chi$ .

Das solcherart entworfene Modell wird hier fortan als *Modell A* des  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$ -Duplexes bezeichnet; es ist in *Fig. 27–29* (jeweils links aussen) sowie in *Fig. 30* und *32* illustriert. Die auf den NMR-spektroskopischen Beobachtungen beruhenden Distanz-Begrenzungen (NOE constraints), die man bei diesem Modell-Entwurf durch Torsionswinkel-Anpassungen einzuhalten versuchte, sind in *Tab. 3* enthalten, und die Werte der Rückgrat-Torsionswinkel in diesem Modell sind in *Tab. 4* zusammen mit den Standardwerten des zugehörigen idealisierten linearen Modells (= Einzelstrang-Einstiegsmodell) aufgeführt.

Tab. 3. NMR-Spektroskopisch ermittelte NOE-Distanzeinschränkungen und obere Distanzlimiten für die H-Brücken in  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2^*$

| Intranucleotid-NOE's |                      | Distanz [Å] | Sequentielle NOE's |              | Distanz [Å] |
|----------------------|----------------------|-------------|--------------------|--------------|-------------|
| H5' $\alpha$         | H1' $\alpha$         | 3,0         | H3' $\alpha$       | H6'R         | 5,0         |
| H5' $\alpha$         | H3' $\alpha$         | 3,0         | H3' $\beta$        | H6'R         | 5,0         |
| H3' $\alpha$         | H1' $\alpha$         | 3,0         | H1' $\alpha(i)^a$  | H2(i+1) $^a$ | 5,0         |
| H4' $\beta$          | H2' $\beta$          | 3,0         | H2' $\alpha(i)^a$  | H2(i+1) $^a$ | 5,0         |
| H2' $\beta^a$        | H8 $^a$              | 3,0         |                    |              |             |
| H2' $\alpha^a$       | H8 $^a$              | 4,0         |                    |              |             |
| H2' $\beta^b$        | H6 $^b$              | 3,0         |                    |              |             |
| H2' $\alpha^b$       | H6 $^b$              | 4,0         |                    |              |             |
| Interstrang-NOE's    |                      | Distanz [Å] | H-Brücken          |              | Distanz [Å] |
| H2(i) $^a$           | H1' $\alpha(10-i)^c$ | 5,0         | N(6)H $^a$         | O4 $^b$      | 3,3         |
| H2(i) $^a$           | H2' $\alpha(10-i)^c$ | 5,0         | N(3)H $^b$         | N1 $^a$      | 2,8         |

\* ) Upper-distance constraints used in the AMBER energy minimization of the CONFOR *Models A* and *B*.

<sup>a</sup>) In adenine residues; <sup>b</sup>) in thymine residues; <sup>c</sup>) in thymine residues, except for NOEs with A5.

Tab.4. Torsionswinkel der CONFOR-Modelle A und B von  $[ddGlc(A_5-T_5)]_2$  vor und nach Moleküldynamik-Verfeinerung während 2 ps mit dem Programm AMBER [27]. Zum Vergleich: Idealierte Torsionswinkelwerte der paarungsfähigen (linearen) Homo-DNA-Einzelstrangmodelle mit  $(-sc/-sc)$ - bzw.  $(ap/-sc)$ -Phosphodiester-Konformation aus der qualitativen Konformationsanalyse [1] [3]\*

| Torsionswinkel<br>( $0 \rightarrow \pm 180^\circ$ )<br>(vgl. Schema 1) | 1<br>Idealisiertes<br>Modell<br>Phosphodiester-<br>Konformation<br>$-sc/-sc$ [1] [3] | 2<br>Idealisiertes<br>Modell<br>Phosphodiester-<br>Konformation<br>$ap/-sc$ [1] [3] | 3<br>CONFOR-<br>Modell A<br>(Fig. 27,<br>links) | 4<br>Modell A<br>(AMBER-<br>minimisiert)<br>(Fig. 33,<br>links) | 5<br>CONFOR-<br>Modell B<br>(Fig. 27,<br>Mitte) | 6<br>Modell B<br>(AMBER-<br>minimisiert)<br>(Fig. 33,<br>rechts) |
|--|--|---|---|---|---|--|
| $\alpha$   | $-60^\circ$  | $180^\circ$   | $-80^\circ$                                     | $-56 \rightarrow -72^\circ$                                     | $-178^\circ$                                    | $165 \rightarrow -167^\circ$                                     |
| $\beta$  | 180  | 180   | $-172$  | $155 \rightarrow 172$   | $-174$  | $173 \rightarrow -136$   |
| $\gamma$   | 60   | 180   | 78  | $64 \rightarrow 86$   | 180   | $160 \rightarrow -174$   |
| $\delta$   | 60   | 60  | 64  | $49 \rightarrow 67$   | 62  | $50 \rightarrow 61$  |
| $\epsilon$   | 180  | 180   | 180   | $-137 \rightarrow -178$   | $-175$  | $-154 \rightarrow -180$  |
| $\zeta$  | $-60$  | $-60$   | $-60$   | $-68 \rightarrow -80$   | $-71$   | $-59 \rightarrow -105$   |
| $\chi$ (A)   | $-120$   | $-120$  | $-79$   | $-75 \rightarrow -91$   | $-83$   | $-108 \rightarrow -119$  |
| $\chi$ (T)   | $-120$   | $-120$  | $-81$   | $-101 \rightarrow -139$   | $-93$   | $-78 \rightarrow -113$   |

- \*) Backbone torsion angles  $\alpha \rightarrow \zeta$  and torsion angle  $\chi$  at the nucleosidic bond in  $[ddGlc(A_5-T_5)]_2$  models. From left to right: 1. (for comparison) idealized single-strand model with  $-sc/-sc$  phosphodiester conformation [1] [3]; 2. (for comparison) idealized single-strand model with  $-sc/ap$  phosphodiester conformation [1] [3]; 3. CONFOR-Model A (Fig. 27, left); 4. CONFOR-Model A after AMBER energy minimization, restrained molecular dynamics (2 ps) and second energy minimization using the distance constraints of Table 3 (Fig. 33, left); 5. CONFOR-Model B (Fig. 27, center); 6. CONFOR-Model B after energy minimization, as above (Fig. 33, right). For angle deviations at the A5  $\rightarrow$  T5 transition, see [6].

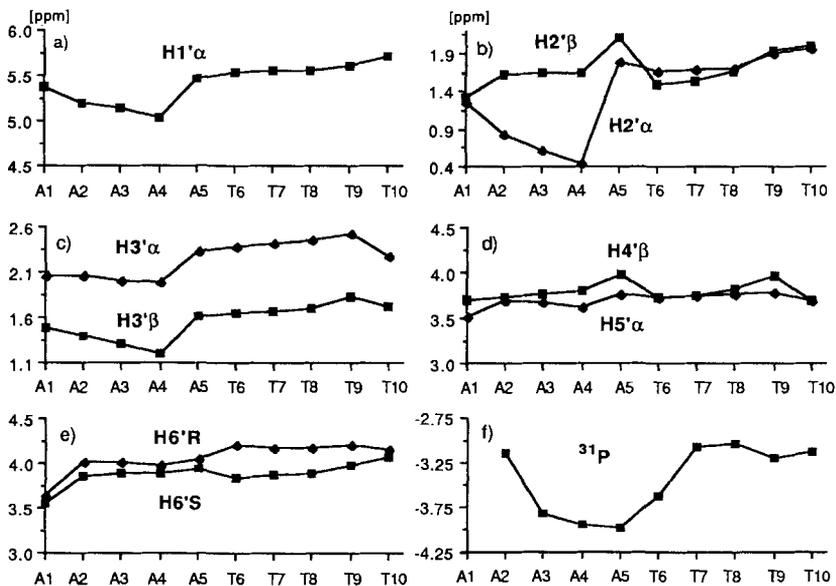
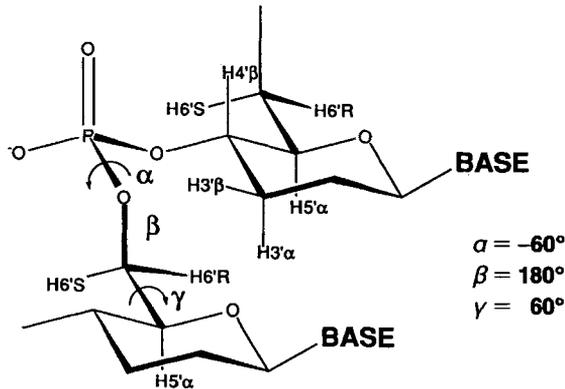


Fig. 26. Sequenzabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Pyranose- $^1H$ - und der  $^{31}P$ -Resonanzen\*)

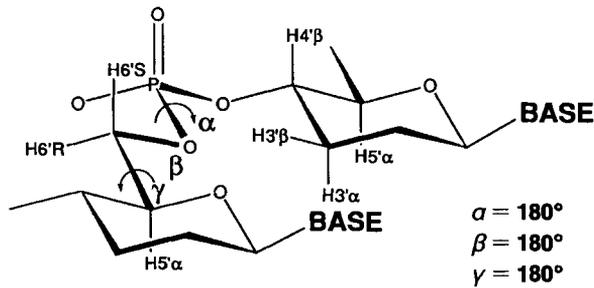
- \*) Sequence dependence of the chemical shifts shows several difference between the adenine and the thymine segments. The large upfield shifts of the H2 $\alpha$  resonances of A2–A4 (b) are explained by the ring current effect of the sequentially neighboring adenine base (see Fig. 30–32).

Schema 9. Nucleotid-Einheiten der Modelle A und B in idealisierter Konformation (vgl. [1] [3])\*

**Modell A (idealisiert)**



**Modell B (idealisiert)**



\*) The two idealized linear backbone conformations of homo-DNA [1] [3] which correspond to CONFOR Models A and B (Fig. 27, Table 4). Model A is transformed into Model B by rotation around the  $\gamma$  axis by  $+120^\circ$  and around the  $\alpha$  axis by  $-120^\circ$ , while  $\beta$  keeps the value of  $180^\circ$ . The phosphodiester conformation is *-gauche/-gauche* (*-sc/-sc*) in A and *-gauche/trans* (*-sc/ap*) in B. See the discussion referring to Fig. 27.

Der Vergleich der Torsionswinkel-Werte von *Modell A* mit den entsprechenden Linearwerten zeigt, dass durch die vorgenommenen Torsionswinkel-Veränderungen der Konformationstyp der Rückgrat-Kette nicht ändert, d. h. das Duplex-Modell A entspricht im Rückgrat-Konformationstyp seiner antiparallelen Stränge dem linearen (idealisierten) Homo-DNS-Einzelstrang-Modell [1] [3].

Das Doppelstrang-Modell A ist quasi-linear mit parallel angeordneten Basenpaar-Ebenen, die in Orthogonalabständen von ca. 4,7 Å aufeinanderfolgen. Die quasi-Lineari-tät des Doppelstranges wird vor allem durch die gegenüber dem idealisierten Einzelstrang-Modell durch Drehung im Uhrzeigersinn vom Idealwert  $-120^\circ$  abweichenden nucleosidischen Torsionswinkel  $\gamma$  ermöglicht (vgl. Tab. 4). Der für eine normale Basenstapelung zu grosse Abstand der Basenpaar-Ebenen wird im CPK-Modell der

*Fig. 28* (links aussen) augenfällig. Strang-Achsen und Basenpaar-Ebenen bilden einen Neigungswinkel von *ca.* 60°, wobei die Achsen nicht ganz parallel, sondern (rechtsgängig) leicht gegeneinander verschraubt sind. Das Ausmass der Verschraubung würde einer extrem gestreckten Doppelhelix mit einer Periodizität pro voller Umdrehung von *ca.* 120 Nucleotid-Einheiten entsprechen.

Das Modell steht – mit den unten behandelten Ausnahmen – in Übereinstimmung mit den NMR-spektroskopischen Beobachtungen. Ein wichtiger Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Deutung der auffallenden Hochfeld-Verschiebung der H2'α-Protonen der Nucleotid-Einheiten A2 bis A4 (vgl. *Fig. 26*). Diese Verschiebungen sind auf Ringstrom-Abschirmung [24] zurückzuführen, da die H2'α-Protonen der genannten Adenin-Nucleotide direkt über den Purin-Ringen der sequentiell nachfolgenden Adenin-Nucleotide liegen (*Fig. 30* und *32*). Demgegenüber erfahren die H2'α-Protonen der Nucleotide A5–T10 nur einen schwachen Ringstrom-Effekt, da diese Protonen über den Pyrimidin-Ringen der Thymin-Nucleotide liegen (*Fig. 30*). Der Abschirmungseffekt tritt in abgeschwächter Form auch bei den H1'α- und H3'α,β-Protonen von A2–A4 auf, was ebenfalls in qualitativer Übereinstimmung mit dem Modell steht. Das Fehlen einer Hochfeld-Verschiebung bei den Pyranosyl-Protonen von A1 ist durch die erhöhte Beweglichkeit endständiger Nucleotid-Einheiten zu erklären.

Die zwischen *Modell A* und NMR-spektroskopischen Daten verbleibenden Widersprüche führten zur Betrachtung eines Alternativ-Modells (*Modell B*), das im Anschluss an die Auflistung der 'Mängel' des *Modells A* erörtert wird. Diese Mängel sind die folgenden.

zu *Fig. 27*

→

- \*) CONFOR Models of [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)<sub>2</sub>] (*left and center*) and of the corresponding duplex of the natural series d(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)<sub>2</sub> in the *B*-type conformation (*right*). Computer-assisted modeling [23] of the homo-DNA duplex used as its initial condition the linear idealized homo-DNA single-strand model described in Part I of this series [1] (*Scheme 1*), and incorporated structural data for the bases and the phosphodiester groups used earlier [7]. Duplex *Model A* (*left*) is the result of an empirical accommodation, within the major distance constraints set by the NMR analysis (*Table 3*), of two ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>) single-strand models in antiparallel orientation by means of successive adjustments of torsion angles (*Table 4*). The *Model A* is *quasi-linear*. Among persisting inconsistencies between *Model A* and the NMR data, two are crucial. First, the model's internucleotide distances between H3'α and H6'R of the sequentially succeeding nucleotide are *ca.* 2.3 Å, in contradiction to the observed corresponding NOEs, which are relatively weak (*Scheme 4, Fig. 15*). Second, *Model A* contains the fragment P–O–C(6')–C(5')–H5'α in an approximate 'W arrangement,' but a corresponding four-bond correlation in the [<sup>31</sup>P, <sup>1</sup>H]-NMR spectrum is not observed (*Fig. 13*). The *Model B* (*center*) resolves these two inconsistencies. Its conformation type corresponds to the idealized linear homo-DNA single-strand model which contains *gauche-trans*-phosphodiester groups [1] [3]. *Model B* differs from *Modell A* in having the torsion angles α shifted by *ca.* –120° and the torsion angles γ by *ca.* +120°. Since the two torsion axes are approximately parallel to each other (*Scheme 9, Fig. 32*), the *Model B* is also *quasi-linear*. *Model B* contradicts the NMR data in a manner complementary to *Model A*. *Model B* contradicts (while *Model A* agrees with) the observation that coupling constants between H5'α and H6'R(S) protons are approximately equal, and distinctly smaller than the coupling constants expected for antiperiplanar vicinal protons, *e.g.*, H5'α and H4'β. Furthermore, it contradicts (while *Model A* again agrees with) the NOEs between the H3'α(β) and H6'R(S) protons, which are, on average, stronger for the H6'R, than with H6'S (*Scheme 4*). All crucial NMR observations can be rationalized, if it is assumed that the homo-DNA duplex [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>5</sub>)<sub>2</sub>] exists in an equilibrium of conformers including the *Models A* and *B* as extremes, which undergo rapid exchange with respect to the NMR time scale. The experimental data available are not sufficient to characterize this hypothetical equilibrium more precisely.

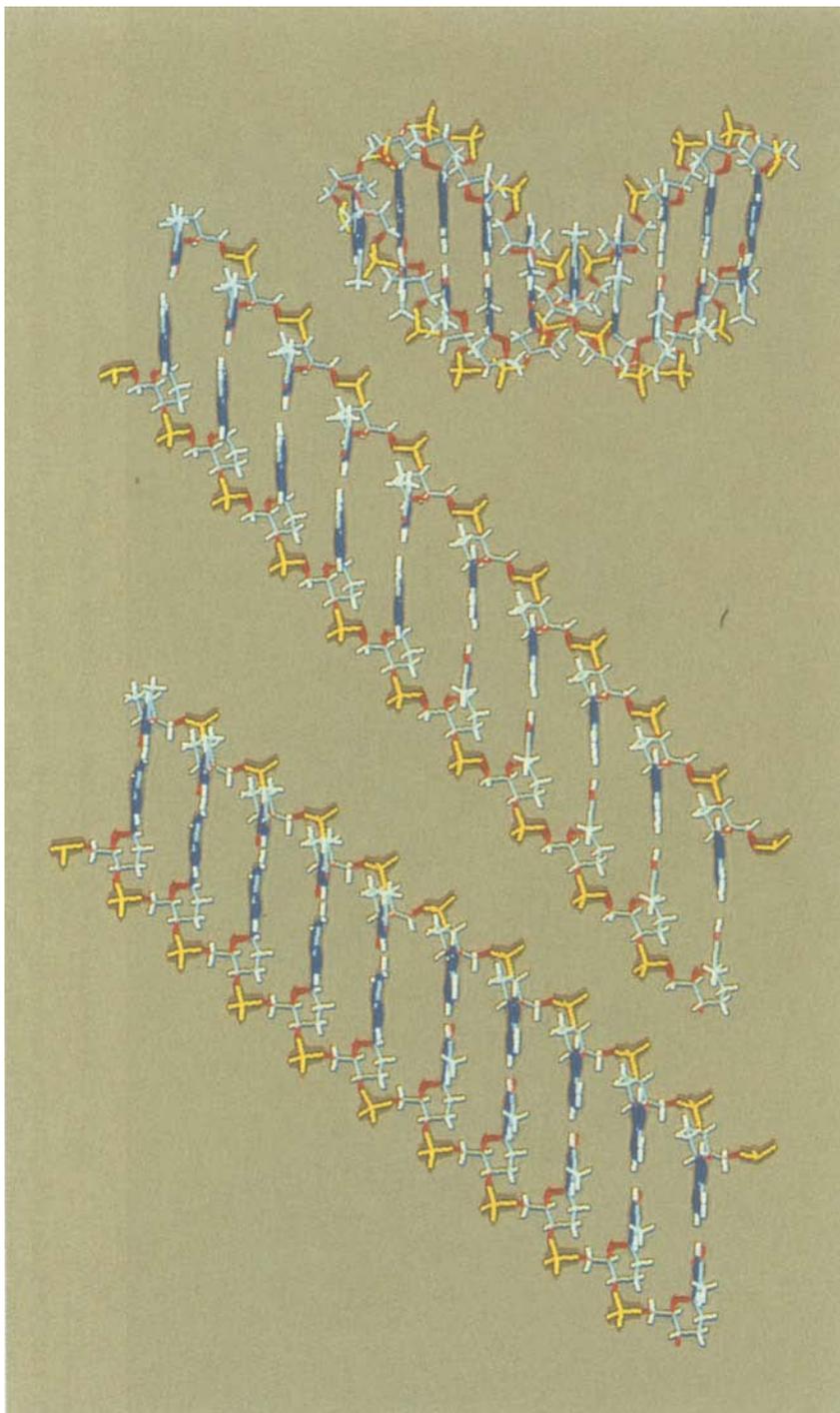


Fig. 27. CONFOR-Modelle A und B von  $[ddGlc(A_5-T_5)]_2$  und CONFOR-Modell von  $[d(A_5-T_5)]_2$  (B-DNA-Typ). Bindung-Farbcodes: P-O gelb, C-O rot, C-N blau, C-C grau, C-H und N-H weiss; betreffs CONFOR-Programm vgl. [23]\*).

\*) See p. 2742.

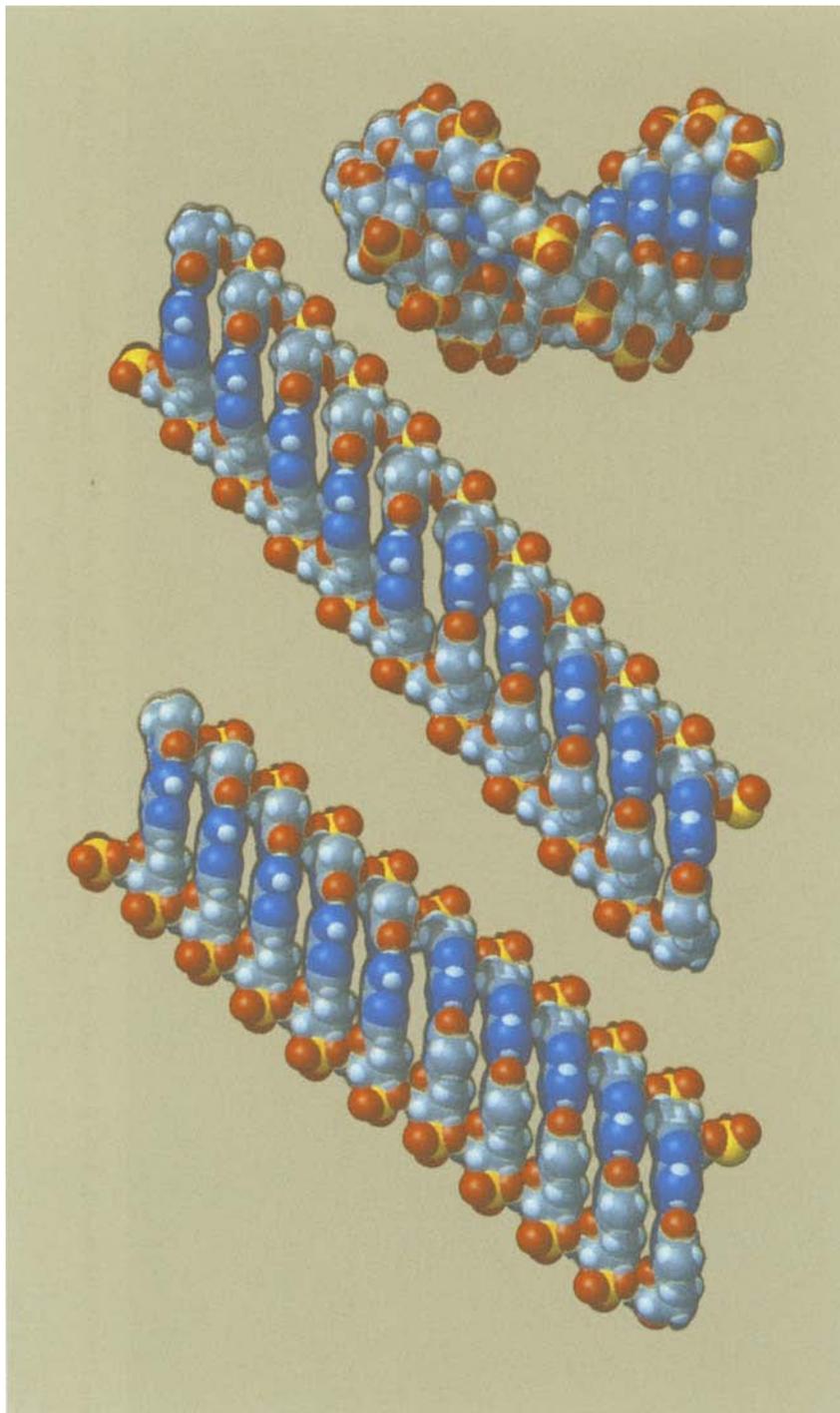


Fig. 28. CONFOR-Modelle von Fig. 27 raumfüllend. Atom-Farbcode: P gelb, O rot, N blau, C grau, H weiss\*)

\*) CONFOR Models of Fig. 27 in CPK representation. Atom color code: P: yellow, O: red, N: blue, C: grey, H: white; note the contrast between the two quasi-linear (and, therefore, 'longer') homo-DNA models and the helical (and, therefore, 'shorter') B-DNA model with respect to base-pair stacking (orthogonal base pair distances ca. 4.7 Å (Model A) and ca. 4.3 Å (Model B) vs. ca. 3.4 Å (B-DNA model)).

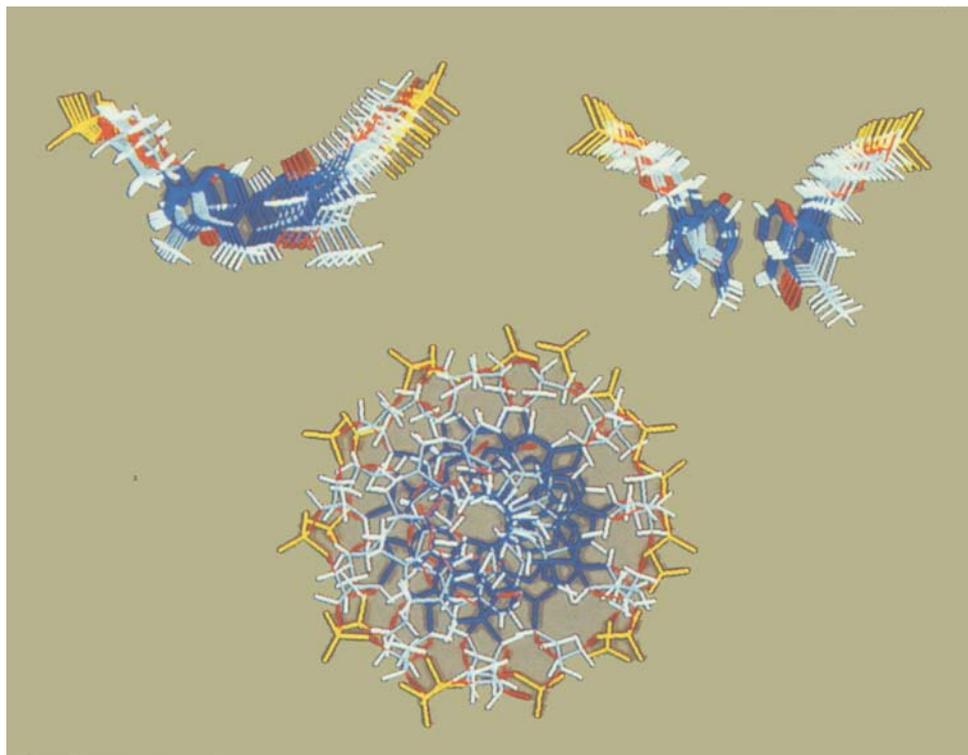


Fig. 29. CONFOR-Modell A und B von  $[ddGlc(A_5-T_5)]_2$  und CONFOR-Modell von  $[d(A_5-T_5)]_2$ . Ansichten entlang Strang-, bzw. Helix-Achse\*).

\*) CONFOR Models of Fig. 27 viewed along double-strand axes (B-DNA model: along helical axis).

Die intranucleotidischen Abstände sowohl zwischen den Phosphodiester-O6'-Atomen und den äquatorialen H3' $\beta$ -Protonen, als auch zwischen den Thymin-H6-Protonen und den Pyrnaose-H2' $\beta$ -Protonen sind kürzer als die Summe der entsprechenden *van-der-Waals*-Radien. Die Intrastrang-NOEs zwischen den H2-Protonen der Adenin-Basen und den H2' $\alpha$ -Pyranose-Ring-Protonen der sequentiell nachfolgenden Thymin-Nucleotid-Einheit des Partnerstranges (vgl. Fig. 16 und Schema 5) sind im ROESY-Spektrum (nicht abgebildet) von so grosser Intensität, dass der Abstand dieser Protonen zueinander höchstens *ca.* 3,0 Å betragen sollte. Im *Modell A* sind diese Abstände jedoch 4,2 Å bzw. 4,7 Å. Gemäss den beobachteten relativen NOE-Intensitäten sollten weiter die H2-Protonen der Adenin-Basen näher bei den sequentiell benachbarten H2' $\alpha$ - als den H1' $\alpha$ -Protonen liegen. Im *Modell A* ist das Gegenteil der Fall. Für T6, T7 und T8 gibt es intranucleotidische NOE-Kreuzpeaks zwischen den H6-Signalen der Thymin-Basen und den H6'*S*-Resonanzen der CH<sub>2</sub>(6')-Gruppe (Fig. 12, b), die auch bei kurzer Mischzeit (40 ms) im NOESY-Spektrum auftreten. Im *Modell A* sind die intranucleotidischen Abstände zwischen den H6-Protonen der Thymin-Basen und den H6'*R(S)*-Protonen mit 6,0 Å bzw. 6,2 Å zu gross, als dass solche direkte NOEs erwartet wären [8]. Im *Modell A* liegt das

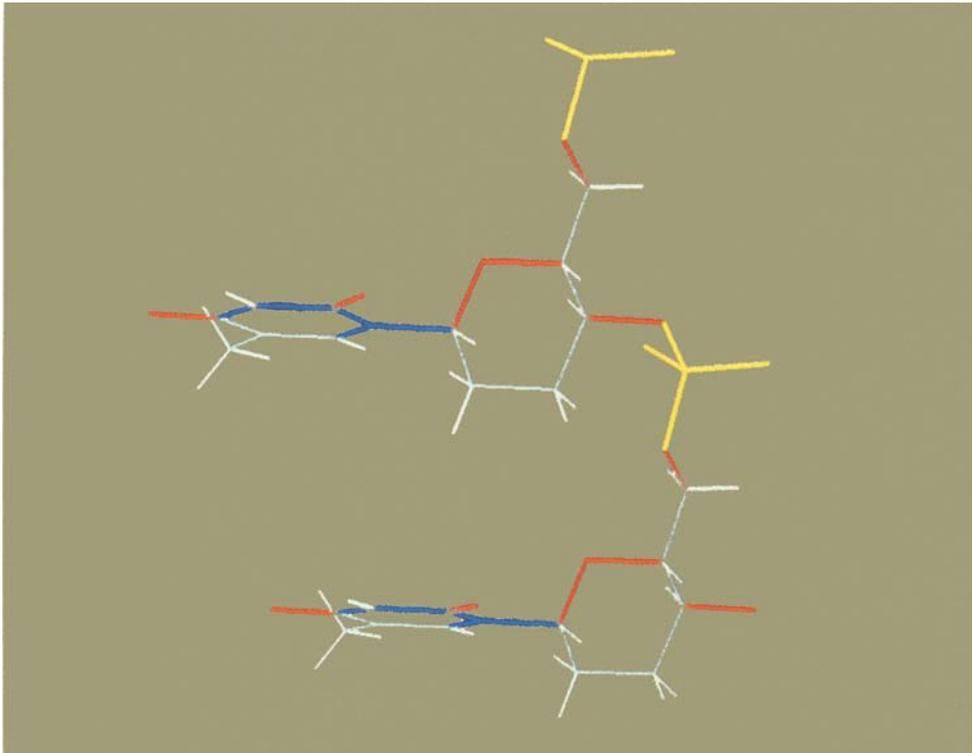


Fig. 30. CONFOR-Modell A (Ausschnitt)\*

- \*) Detail of CONFOR *Model A*. Note the position of the equatorial H2' $\alpha$  protons relative to the base of the succeeding nucleotide units; the H2' $\alpha$  protons of A1–A4 are exposed to the ring current of neighboring adenine unit (see Fig. 32). Bond color code: P–O: yellow, C–O: red, C–N: blue, C–C: grey, C–H and N–H: white; for torsion angles, see Table 4.

Phosphodiester-O6'-Atom einer gegebenen Nucleotid-Einheit ungefähr antiperiplanar zum zugehörigen H5' $\alpha$ -Proton. Damit kommen die vier Bindungen zwischen dem P-Atom und dem axialen H5' $\alpha$ -Proton ungefähr in eine 'W'-förmige Anordnung. Im [ $^{31}\text{P}$ ,  $^1\text{H}$ ]-Spektrum (Fig. 13) fehlen die bei einer solchen W-Anordnung zu erwartenden Vierbindungskorrelationen zwischen  $^{31}\text{P}$  und H5' $\alpha$ <sup>12</sup>). Schliesslich betragen die intranucleotidischen Abstände zwischen den axialen H3' $\alpha$ -Protonen und den H6'R-Protonen im *Modell A* nur 2,3 Å, während im NOESY-Spektrum keine besonders starken NOEs gefunden wurden (Schema 4 und Fig. 15).

Vor allem die beiden letztgenannten Widersprüche waren es, welche die Miteinbeziehung eines alternativen Struktur-Modells in unsere Betrachtungen auslösten. Dieses *Modell B* ist in den Fig. 27–29 (jeweils mittleres Objekt) sowie in Fig. 31 und 32 abgebildet,

<sup>12</sup>) In DNS-Oligonucleotid-Duplexen kann zwischen  $^{31}\text{P}$  und H4' $\alpha$  eine solche Vierbindungskopplung beobachtet werden, die grösser ist als die  $^3J(^{31}\text{P}, ^1\text{H})$ -Kopplungen zu den CH<sub>2</sub>(5')-Protonen [25]. Die Vierbindungskopplung wurde auch für den Paarungskomplex von ddGlc(A<sub>6</sub>) beobachtet [26].

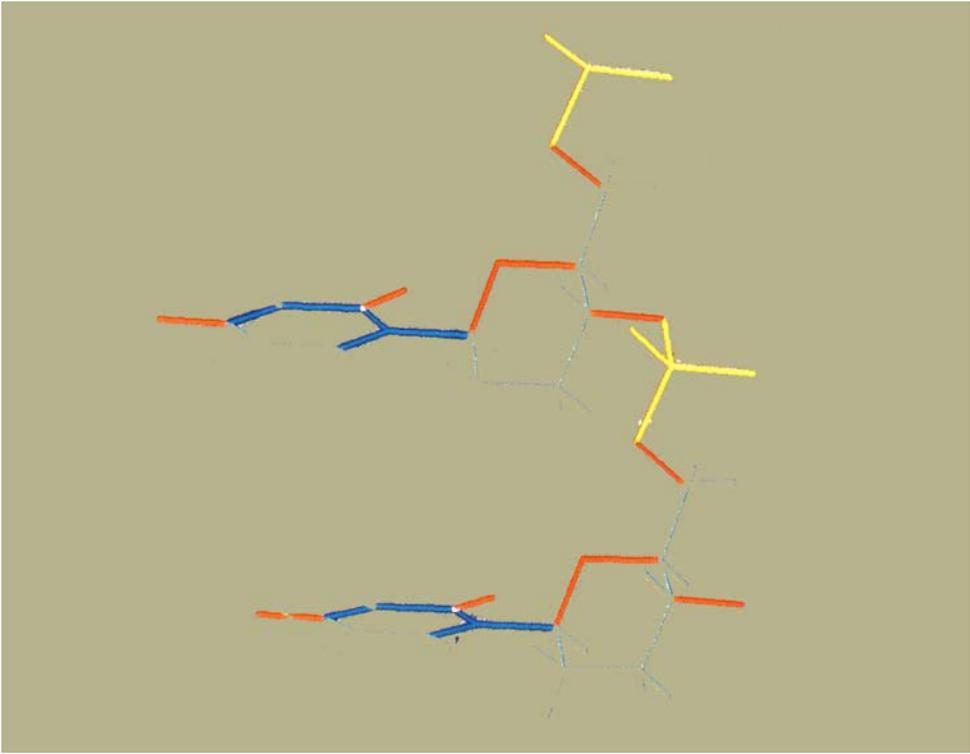


Fig. 31. CONFOR-Modell B (Ausschnitt)\*

\* ) Detail of CONFOR *Model B*. Bond color code as in Fig. 30; for torsion angles, see Table 4.

Tab. 4 orientiert über seine Torsionswinkel-Daten und *Schema 9* erläutert in idealisierter Form den Konformationstyp seiner Mononucleotid-Einheit im Vergleich zu jenem des *Modells A*.

Im *Modell B* gibt es keine *W*-förmige Anordnung der Bindungen P–O–C(6′)–C(5′)–H5′ $\alpha$ , und die intranucleotidischen Abstände zwischen H3′ $\alpha$  und H6′*R* liegen zwischen 3,2 und 4,7 Å, was im Einklang mit den entsprechenden NMR-spektroskopischen Daten ist. Das *Modell B* liegt konformationell dem *Modell A* insofern nahe, als der Übergang *A*  $\rightarrow$  *B* durch zwei gegenläufige, etwa gleich grosse Drehungen um die Torsionsachsen  $\alpha$  und  $\gamma$  bewerkstelligt wird; in der idealisierten Version der beiden Konformationstypen handelt es sich um die Drehungen  $\alpha(A) = -60^\circ \rightarrow \alpha(B) = -180^\circ$  und  $\gamma(A) = +60^\circ \rightarrow \gamma(B) = +180^\circ$  (vgl. *Schema 9* und Fig. 32). Bei dieser Kurbelwellen-artigen Bewegung bleibt beim Übergang *A*  $\rightarrow$  *B* der Torsionswinkelwert  $\beta$  von ca.  $180^\circ$  erhalten, die beiden Rotation- (bzw. Bindung-) Achsen  $\alpha$  und  $\gamma$  behalten ihre annähernd parallele Lage, und die *quasi*-Linearität des Doppelstrangs bleibt bestehen. Da in beiden Duplex-

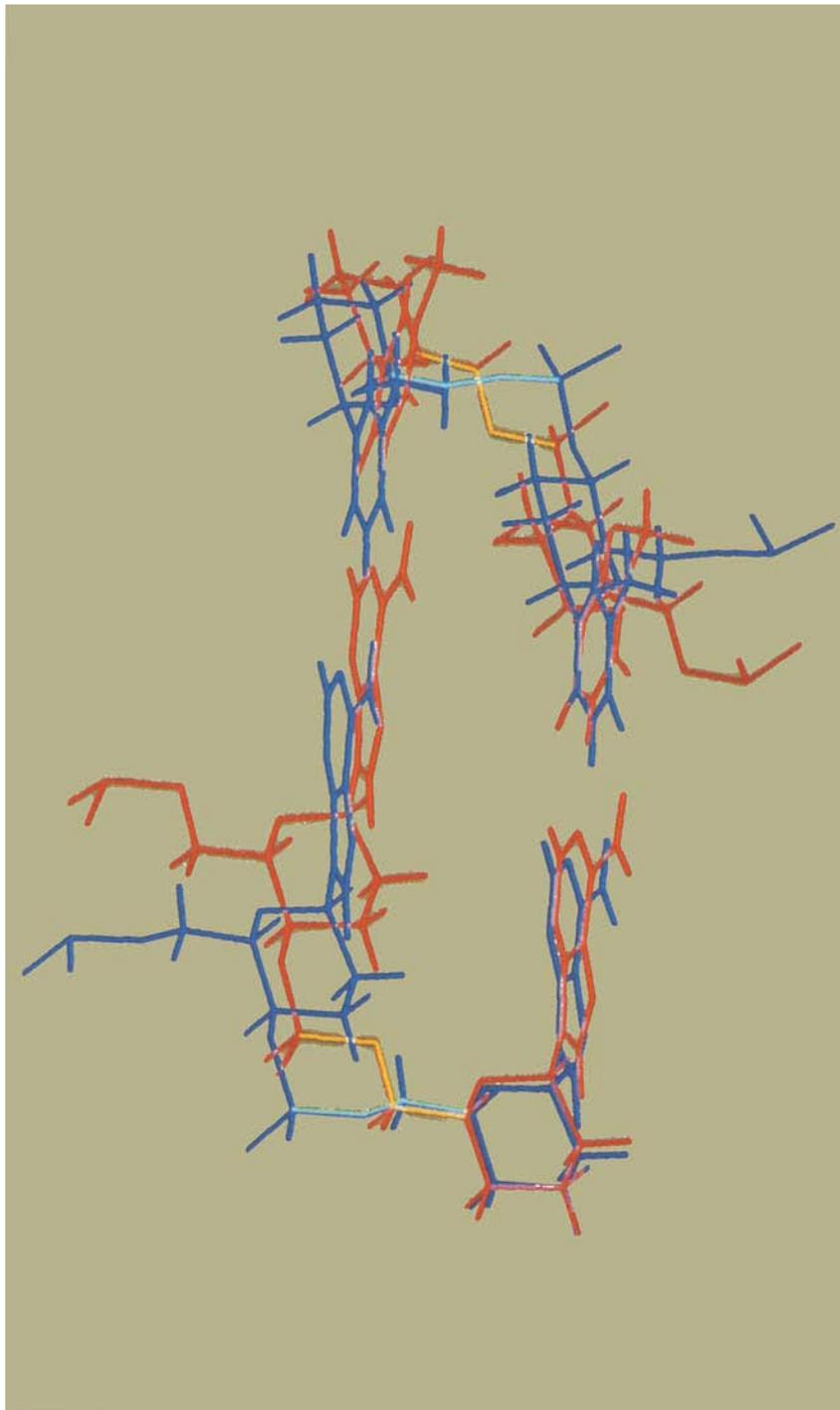


Fig. 32. Überlagerung der CONFOR-Modelle A und B (Ausschnitt). Farbcode: Modell A: blau, Modell B: rot, Drehachsen  $\alpha$  und  $\gamma$  hell (s. Text)\*).

\*) Superposition of dinucleotide units of CONFOR Models A (blue) and B (red). Note that torsion axes  $\alpha$  and  $\gamma$  (bright) are approximately parallel before and after the  $\pm 120^\circ$  rotations which interconvert Models A and B. Because these axes are approximately perpendicular to the base-pair planes, the interconversion of Models A and B does not require transient dissociation of base pairs (see torsion angles  $\gamma$  in Table 4).

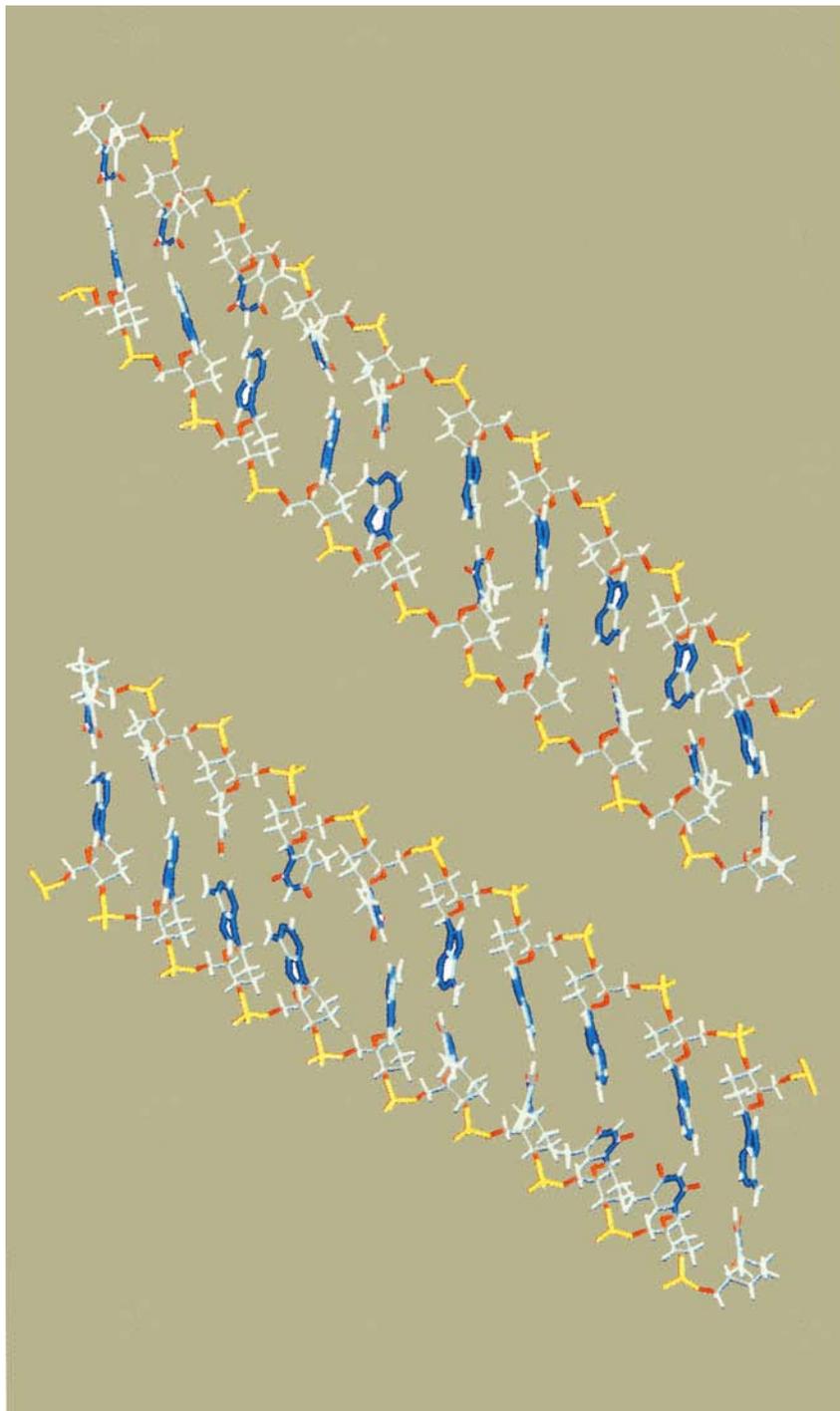


Fig. 33. Moleküldynamik-Modelle von  $[ddGlc(A_5-T_5)]_2$  (AMBER, 2 ps) ausgehend von CONFOR-Modellen A und B\*)

\*) CONFOR Models A and B after refinement using the program AMBER [27] by energy-minimization and molecular-dynamics simulations (2 ps, 300° K.) in a water bath.

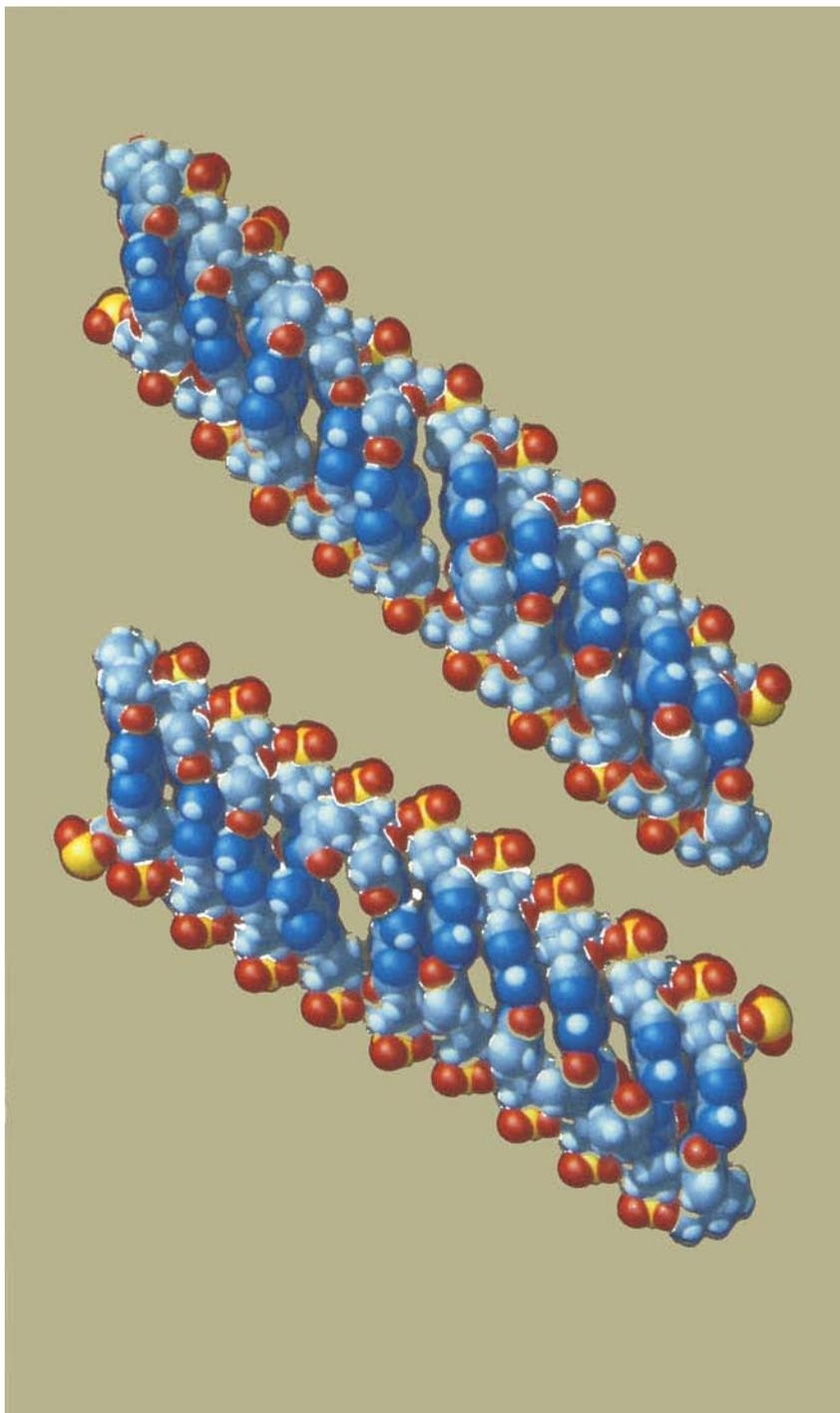


Fig. 34. Moleküldynamik-Modelle von Fig. 33 raumfüllend\*)

\*) CPK Version of the models shown in Fig. 33.

*Modellen A und B* die Torsionswinkel  $\chi$  ca.  $-90^\circ$  betragen, stehen die beiden Rotationsachsen der Kurbelwellen-Bewegung um  $\gamma$  und  $\alpha$  annähernd senkrecht auf den Basenebenen; dadurch ist ein Übergang zwischen den *Modellen A und B* möglich, ohne dass dies eine vorübergehende Trennung der Basenpaare erfordert. Die äusserlich auffälligste Konsequenz des Übergangs  $A \rightarrow B$  ist die Veränderung des Neigungswinkels zwischen den Ebenen der Basenpaare und der Richtung der Strang-Achsen; dieser beträgt ca.  $60^\circ$  im *Modell A* und ca.  $45^\circ$  im *Modell B* (Fig. 27; der hier bezeichnete Winkel ist das  $90^\circ$ -Komplement zur Basen-Inklination, welche zur Beschreibung von Doppelhelix-DNA verwendet wird). Der Basenabstand im *Modell B* ist mit ca.  $4,3 \text{ \AA}$  jedoch nur wenig kürzer als derjenige von *Modell A* (ca.  $4,7 \text{ \AA}$ ); im Vergleich zum optimalen Stapelungsabstand von ca.  $3,4 \text{ \AA}$  ist er nach wie vor sehr gross.

Im Rückblick erkennt man, dass das *Modell B* bemerkenswerterweise jenem linearen Homo-DNS-Einzelstrang-Modell entspricht, welches bei der qualitativen Konformationsanalyse des Homo-DNS-Einzelstrangs als zweiter paarungsfähiger Konformationstyp anfällt, wenn man die Beschränkung auf den synclinal-synclinalen Phosphodiester-Konformationstyp relaxiert und die synclinal-antiperiplanare Phosphodiester-Gruppierung zulässt (vgl. *Schema 9* sowie die Teile I [1] und III [3] dieser Reihe).

Von zwei wichtigen (unten erörterten) Widersprüchen sowie zwei (auch im *Modell A* bestehenden) intranucleotidischen Distanz-Unterschreitungen<sup>13)</sup> abgesehen, ist das *Modell B* mit den NMR-Daten besser vereinbar als das *Modell A*. So sind die Intra- und Interstrang-Abstände der Adenin-H2-Protonen zu den H2' $\alpha$ -Protonen mit  $2,9$  bzw.  $3,5 \text{ \AA}$  in besserer Übereinstimmung mit den ROESY-Daten als die entsprechenden Abstände im *Modell A*; die Intrastrang-Abstände der Adenin-H2-Protonen zu den H2' $\alpha$ -Protonen des sequentiell nachfolgenden Pyranose-Rings sind etwas kürzer als zu den entsprechenden H1' $\alpha$ -Protonen, was wiederum in Übereinstimmung mit den beobachteten relativen NOE-Intensitäten ist. Der intranucleotidische Abstand zwischen den Thymin-H6- und den H6' $S$ -Protonen liegt um  $5,1 \text{ \AA}$ ; er lässt sich durch geringe Erweiterung des  $\chi$ -Winkels bis auf ca.  $4 \text{ \AA}$  verkürzen, so dass nunmehr entsprechende NOEs möglich scheinen<sup>14)</sup>. Wie für das *Modell A* werden auch für das *Modell B* Ringstrom-Verschiebungen für die Adenin-H2' $\alpha$ -Protonen erwartet, wie sie im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum beobachtet wurden (Fig. 31 und 32). Andererseits vermag das *Modell B* die Tatsache nicht zu deuten, dass die intranucleotidischen NOEs zwischen H3' $\alpha,\beta$  und H6' $R$  stärker sind als zwischen H3' $\alpha,\beta$  und H6' $S$  (vgl. Fig. 15 und *Schema 9*). Vor allem aber sind die H5' $\alpha$ - und H6' $S$ -Protonen im *Modell B* antiperiplanar angeordnet, was in direktem Widerspruch zur Beobachtung steht, dass die Kopplungskonstanten zwischen diesen Protonen deutlich kleiner sind als zwischen H5' $\alpha$  und H4' $\beta$  (*Abschn. 3.1*).

*Es fällt auf, dass jedes der beiden Modelle A und B zwar einen jeweils zum anderen Modell komplementären Teil der NMR-Daten, jedoch nicht für sich allein die Gesamtheit der NMR-Daten zu befriedigen vermag. Ein möglicher Ausweg aus dem Dilemma ist die*

<sup>13)</sup> Es betrifft dies den intranucleosidischen Abstand von  $2,0 \text{ \AA}$  zwischen dem Rückgrat-O6'-atom und dem äquatorialen H3' $\beta$ -Proton sowie denjenigen von  $1,6 \text{ \AA}$  zwischen dem Thymin-H6-Proton und axialen H2' $\beta$ -Proton.

<sup>14)</sup> Die Konfigurationszuordnung der H6' $R(S)$ -Protonen aufgrund der (H6,H6' $S$ )-NOEs bleibt für das *Modell B* unverändert, d. h. gemäss *Schema 1*.

Annahme eines gegenüber der NMR-Zeitskala sich rasch einstellenden Gleichgewichts zwischen Konformeren vom Konformationstyp des *Modells B* und Konformeren, die im Grenzfall dem Konformationstyp des *Modells A* entsprächen. Die zeitliche Mittelung würde einerseits die grosse, für die antiperiplanare Lage gemäss *Modell B* zu erwartende Kopplungskonstante zwischen H5' $\alpha$  und H6' $S$  reduzieren und andererseits die für die intranucleotidischen NOEs zwischen H3' $\alpha,\beta$  und H6' $R(S)$  beobachteten Intensität-Verhältnisse erklären, da der NOE zwischen H3' $\alpha,\beta$  und H6' $R$  im Grenzkonformationstyp *A* besonders stark sein sollte. Ein solches Gleichgewicht zwischen einer Schar von verschiedenen Rückgrat-Konformeren mit einer (bei 50°) kurzen Lebensdauer bezüglich der durch die chemischen Verschiebungsunterschiede gegebenen Zeitachse könnte auch die Beobachtung verständlich machen, dass die chemischen Verschiebungen und die Linienbreiten der H1' $\alpha$ - und H2' $\alpha$ -Protonen-Resonanzen ganz besonders im Bereich der Adenosin-Nucleotid-Einheiten temperaturabhängig sind (vgl. *Fig. 1* und die Resonanz-Zuordnungen in *Fig. 2*). Da die Ringstrom-Verschiebungen der Adenosin-Pyranose-Protonen stark vom Abstand und der Orientierung der benachbarten Purin-Ringe abhängen, würde eine Variation der Basen-Orientierungen gemäss den Unterschieden zwischen den Konformationstypen *A* und *B* insbesondere die chemischen Verschiebungen dieser Protonen beeinflussen. Erst ab etwa 50°, wo gegebenenfalls die Umwandlungsraten zwischen den verschiedenen Konformeren deutlich grösser wären als ihre chemische Verschiebung-Differenzen, würden – wie beobachtet – auch schmalere Linienformen zu beobachten sein.

Die hier vorgebrachten Hinweise auf das Vorliegen eines dynamischen Gleichgewichts zwischen zwei (oder mehreren) Konformeren im Duplex [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>3</sub>)]<sub>2</sub> sind alle indirekt und dementsprechend tentativer Natur. Die verfügbaren experimentellen Daten reichen nicht aus, um auf die Frage nach der Zahl und der detaillierten Struktur sowie wechselseitigen Umwandlungsgeschwindigkeiten der in Frage kommenden Konformeren einzugehen.

Die *Modelle A* und *B* dienen in der Folge als Ausgangspunkt einer mit dem Programm AMBER [27] durchgeführten Suche nach Energie-Minimas im strukturellen Umfeld dieser zwei Konformationstypen. Hierzu wurde der [ddGlc(A<sub>5</sub>-T<sub>3</sub>)]<sub>2</sub>-Duplex zunächst in das Zentrum eines mit H<sub>2</sub>O gefüllten rechtwinkligen Quaders gestellt, dessen Grösse dergestalt gewählt wurde, dass der Duplex von den Wänden des Quaders durch mindestens 6 Å getrennt war. Um Wechselwirkungen zwischen Atomen innerhalb des Quaders mit solchen ausserhalb zu simulieren, wurden bei allen Richtungen periodische Randbedingungen verwendet [27]. Zu den üblichen AMBER-Energiepotentialen, welche Bindungslängen und Bindungswinkel bei ihren Idealwerten halten, Präferenzen für gewisse Torsionswinkel geben, die Bildung von H-Brücken unterstützen sowie *van-der-Waals*-Anziehung und -Abstossung und elektrostatische Punkt-Wechselwirkungen beschreiben, wurden zusätzliche Potentiale für die Erhaltung von kurzen Distanzen entsprechend den experimentellen NOE-Beobachtungen von *Tab. 3* und den *Watson-Crick*-H-Brücken definiert [28]. Diese Potentiale haben die Form  $A(d-u)^6$  (für  $d > u$ , Null sonst), wobei  $d$  eine Distanz in der momentanen Struktur beschreibt und  $u$  die experimentell definierte obere Grenze (*Tab. 3*) zu dieser Distanz darstellt. Die Konstante  $A$  wurde so gewählt, dass eine Verletzung der Distanzgrenze  $u$  um 0,2 Å für Molekülmechanik-Energie-Minimierungen bzw. um 0,5 Å für Moleküldynamik-Rechnungen einer Energie von  $kT/2$  entspricht. Die zwei Konformationen *A* und *B* wurden zunächst einer Energie-Minimierung unterworfen. Anschliessend wurden eine Moleküldynamik-Simulation von

2 ps (bei Zeitschritten von 0,002 ps) bei 300 K und eine erneute Energie-Minimierung durchgeführt.

Die so erhaltenen 'Dynamik-Strukturen' waren den Startstrukturen *A* und *B* sehr ähnlich (r. m. s. d.  $\approx 1,0$  Å vgl. *Tab. 4*) und wiesen keine grösseren Verletzungen der *van-der-Waals*-Abstände und Distanzeinschränkungen (*Tab. 3*) als 0,2 Å auf. Die dem Konformationstyp *B* entsprechende Struktur hat eine etwas günstigere Gesamtenergie als die aus dem Konformationstyp *A* hergeleitete; Skelett- bzw. CPK-Bilder der beiden Dynamik-Strukturen sind in *Fig. 33* und *34* dargestellt. Während die Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\gamma$  des Rückgrates während der kurzen Dynamik-Rechnung im Bereich der Start-Konformationen blieben, waren insbesondere die Planarität der Basenpaare und somit die Basen-Basen-Abstände grösseren Fluktuationen unterworfen. Derartige Fluktuationen im ps-Bereich könnten die relativ grosse Intensität der NOEs zwischen den H2'- und H3'-Pyranose-Ring-Protonen mit dem H2-Proton der sequentiell nachfolgenden benachbarten Adenin-Base erklären, da sie signifikante Populationen von Konformeren mit kurzen Abständen zwischen diesen Protonen erzeugen könnten.

##### 5. Strukturvergleich von $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$ mit dem natürlichen B-DNS-Struktur-Typ. –

Die vorstehend dargelegte NMR-Analyse und anschliessende Modellierung von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$  entwerfen von diesem Homo-DNS-Paarungskomplex ein Strukturbild, das durch zwei miteinander eng verwandte Grenzstrukturen wiederzugeben ist, die durch gegenläufige Rotationen um zwei Einfach-Bindungen ineinander übergehen können. Diese zwei Grenzstruktur-Typen unterscheiden sich von den Standard-Strukturtypen für DNS-Duplexe vor allem durch die *quasi*-Linearität des Doppelstrangs sowie den für eine optimale Basenstapelung zu grossen Abstand der sequentiell benachbarten Basen. Die *Fig. 27–29* geben eine Gegenüberstellung der Modelle *A* und *B* von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$  mit einem Standard-B-DNS-Modell von  $[\text{d}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$ ; der eine Vergleich benutzt die Seitenansicht *senkrecht* zur *quasi*-linearen Doppelstrang-Achse bzw. zur Helix-Achse, und der andere die Aufsicht *entlang* der Doppelstrang- bzw. Helix-Achse. Die unterschiedliche Längenausdehnung der beiden Modelle trotz gleicher Art und Zahl der Bindungen innerhalb der Oligonucleotid-Kette (gleicher Modell-Massstab) veranschaulicht vorab die Verminderung des sequentiellen Basenabstandes durch die helikale Form der B-DNS (vgl. [3]). So wie die Standard-Koordinaten von B-DNS im wesentlichen den zeitlichen Mittelwert einer dynamischen Struktur wiedergeben [29], sind auch die hier vorgeschlagenen Modelle von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$  als Idealisierung der Struktur der Homo-DNS zu betrachten. Da durch die NMR-Messungen nur die Nahordnung der nucleotidischen Strukturelemente festgelegt wird, ist das Ausmass einer helikalen Abweichung von der Linearität mittels der vorliegenden Daten für  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$  nicht direkt erfassbar. Orientierende Modellierungsversuche zeigten, dass eine durchaus mögliche helikale Drehung ('twist') in  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$  nicht mehr als *ca.*  $+10^\circ$  pro Basenpaar betragen sollte. In natürlicher B-DNS wurde ein ähnlich grosser Bereich für die Abweichungen von der optimalen, helikalen Drehung von *ca.*  $36^\circ$  pro Basenpaar für die einzelnen Basenpaare in einem DNS-Fragment beobachtet [30].

In A-, B- und auch Z-DNS beträgt der (orthogonale) Abstand sequentiell benachbarter Basen durchwegs *ca.* 3,4 Å, und der dadurch gegebenen optimalen Basenpaar-Stapelung wird ein wesentlicher Anteil der enthalpischen Stabilisierung der DNS-Duplex-Strukturen zugeschrieben [31]. Die helikale Form der natürlichen DNS-Konformationen

führt dazu, dass die Furanose-Ringe des Rückgrates versetzt gegeneinander, statt übereinander, angeordnet sind, so dass die Basenstapelung durch die relativ voluminösen Zucker-Ringe nicht behindert wird. Nur in Z-DNS sind Basenpaare so gegeneinander verschoben, dass manche der Furanose-Ringe auf die Basenebene von benachbarten Nucleotiden zu liegen kommen [30]. In den zwei hier vorgestellten Struktur-Modellen von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  haben die Basenebenen zwar einen Abstand von *ca.* 4,5 Å, doch liegen die CH<sub>2</sub>-Flanken der Pyranose-Ringe viel näher zu den Ebenen der sequentiell nachfolgenden Basen, als die Deoxyribose-Ringe in der DNS. Als Konsequenz der ausgeprägten Neigung der Einzelstränge gegenüber den Basenpaar-Achsen (*Fig. 27*) weisen die äquatorialen H2'α-Pyranose-Protonen in  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  direkt auf die Ebenen der benachbarten Basen hin, was eine optimale Basenstapelung erschweren oder sogar verhindern könnte.

Es scheint unwahrscheinlich, dass im  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$ -Duplex zwischen den Basen Leerräume vorkommen, wie sie in der raumfüllenden Darstellung (*Fig. 28*) erkennbar sind. In der Moleküldynamik-Rechnung fluktuiert in der Tat nicht nur die relative Orientierung benachbarter Basen, sondern die dabei aufgeweiteten Bereiche zwischen den Basen werden von H<sub>2</sub>O-Molekülen besetzt. Zudem ergibt die Moleküldynamik-Rechnung (2 ps) mit anschließender Energie-Minimierung für einzelne Basenpaare beträchtliche Abweichungen von der koplanaren Anordnung der Paarungspartner. Diese spezifischen Gegebenheiten des Homo-DNS-Struktur-Modells dürften mit dem zentralen experimentellen Befund zusammenhängen, wonach die Imid-Protonen des Thymin-Paarungspartners viel rascher mit dem Lösungsmittel austauschen als dies bei DNS-Duplexen der Fall ist. Zu einer grundsätzlichen Übereinstimmung, sowohl mit den erwähnten strukturellen Gegebenheiten als auch mit den erhöhten Imino-Proton-Austauschgeschwindigkeit, führt ein Vergleich der thermodynamischen Daten für die Duplexierung des  $\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)$ -Stranges mit den entsprechenden Daten für die DNS-Reihe. Unter Standard-Bedingungen (0,15M NaCl, 0,01M *Tris* · HCl-Puffer pH 7) sind für die Duplexierung von  $\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)$  die Werte  $\Delta H = -44,0$ ,  $T\Delta S = -33,5$  (25°) und damit  $\Delta G(25^\circ) = -10,5$  kcal/mol ermittelt worden, während die Vergleichswerte für  $\text{d}(\text{A}_5\text{-T}_5)$  unter identischen Bedingungen bei  $\Delta H = -61,3$ ,  $T\Delta S = -54,2$  und  $\Delta G = -7,1$  kcal/mol liegen [3] [6]. Die geringere enthalpische Begünstigung der Duplexierung von  $\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)$  im Vergleich zu jener von  $\text{d}(\text{A}_5\text{-T}_5)$  entspricht der Vorstellung einer erleichterten, transienten Dissoziation von Basenpaaren, wie sie für den Ablauf des Imid-Proton-Austausches erforderlich sein dürfte. Dies steht nicht etwa im Widerspruch zur höheren thermodynamischen Stabilität von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  im Vergleich mit  $[\text{d}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$ , da die Erhöhung der Stabilität nicht enthalpisch, sondern entropisch begründet ist.

Das wichtige, bei allen bislang untersuchten Duplexen der Homo-DNS-Reihe beobachtete Phänomen des im Vergleich zur DNS-Reihe geringeren Entropie-Verlusts bei der Paarung von Einzelsträngen zu Doppelsträngen ist bislang vor allem mit der konformationellen Präorganisation der Homo-DNS-Einzelstränge in Richtung auf die im Duplex fixierte Rückgrat-Konformation im Zusammenhang gebracht worden [3] [4]. Die durch die NMR-Analyse von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_5)]_2$  aufgedeckte Möglichkeit eines dynamischen Konformation-Gleichgewichts im Homo-DNS-Duplex weist auf einen weiteren Faktor hin, der für die höhere thermodynamische (entropische) Stabilität von Homo-DNS-Duplexen im Vergleich zu DNS-Duplexen mitverantwortlich sein könnte, nämlich die im Vergleich zu DNS-Duplexen höhere Bewegungsfreiheit der Basen im Doppel-

strang, wie sie von der Moleküldynamik-Rechnung nahegelegt wird. Dies entspräche dem Bild einer Homo-DNS-Duplex-Struktur, die als Folge ihres für eine normale Basenstapelung zu grossen Basenabstandes im Paarungs-Kernbereich 'partiell geschmolzen' und damit – auf entsprechende DNS-Strukturen bezogen – enthalpisch destabilisiert und entropisch stabilisiert wäre. Indem der mittlere Basenabstand der Homo-DNS (bzw. der DNS) eine direkte Folge der *quasi*-Linearität (bzw. Helizität) der Rückgrat-Struktur ist, und diese *quasi*-Linearität (bzw. Helizität) sich ihrerseits unmittelbar aus den konformationellen Eigenheiten des Pyranose-Rings (bzw. Furanose-Rings) ergibt [1] [3], führt das aus der NMR-Analyse von  $[\text{ddGlc}(\text{A}_5\text{-T}_3)]_2$  abgeleitete dynamische Strukturmodell die Unterschiede in der Paarungsthermodynamik zwischen Homo-DNS und DNS auf eine zwar qualitative, aber kohärente Weise auf den konstitutionellen Unterschied zwischen der Homo-DNS und der DNS zurück, nämlich auf die Ring-Grösse des Zucker-Bausteins.

Der hier beschriebene Versuch der Struktur-Ermittlung eines Homo-DNS-Duplexes hat einerseits unvorhergesehene Grenzen der NMR-spektroskopischen Strukturbeobachtung in der Homo-DNS-Reihe aufgedeckt, andererseits aber teils vermutete und teils unermutete Grundzüge der Homo-DNS-Struktur festgelegt. Diese beanspruchen Interesse nicht nur für sich selbst, sondern sie ermöglichen darüber hinaus den Blick auf den Struktur-Typ der natürlichen DNS aus einem neuen Gesichtswinkel und helfen dadurch, diesen Struktur-Typ vertieft zu sehen und zu begründen. Einige zentrale Aspekte der Homo-DNS-Struktur konnten mit der hier eingesetzten NMR-Methodik nicht mit atomarer Auflösung bestimmt werden, was wahrscheinlich durch die in Lösung vorliegenden konformationellen Gleichgewichte bedingt ist. Eine Röntgenstruktur-Analyse eines Homo-DNS-Duplexes könnte in dieser Situation ergänzende Informationen liefern, wenn z. B. eine der durch die Modelle A und B beschriebenen Grenzformen in Kristallgitter bevorzugt stabilisiert würde.

Die Arbeit wurde unterstützt vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekte 31-32'033.91 und 20-31'270.91) sowie von der Ciba-Geigy AG, Basel, und der Firmenich SA, Genf. Wir danken Prof. Dr. C. Wintner, Haverford College, Haverford, PA, für seine Mithilfe bei der Abfassung der English summaries.

## 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] J. Hunziker, H.-J. Roth, M. Böhringer, A. Giger, U. Diederichsen, M. Göbel, Ravichandran Krishnan, B. Jaun, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 259.
- [4] A. Eschenmoser, *Nachr. Chem. Tech.* **1991**, 795.
- [5] A. Eschenmoser, *Nova Acta Leopoldina* **1992**, Bd. 67, Nr. 281, S. 201; englische Fassung: A. Eschenmoser, E. Loewenthal, *Chem. Soc. Rev.* **1992**, *21*, 1.
- [6] H.-J. Roth, 'Homo-DNS: Herstellung, Paarungseigenschaften und Struktur von Adenin-/Thymin-haltigen Oligonukleotiden', Diss. Nr. 9591, ETH Zürich, 1991.
- [7] B. Celda, H. Widmer, W. Leupin, W. J. Chazin, W. A. Denny, K. Wüthrich, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1462.
- [8] K. Wüthrich, 'NMR of Proteins and Nucleic Acids', Wiley & Sons, New York, 1986.
- [9] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, 'Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions', Clarendon, Oxford, 1987.
- [10] a) D. Marion, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *113*, 967; b) D. Marion, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1989**, *85*, 393; c) A. Pardi, R. Walker, H. Rapoport, G. Wider, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1652.

- [11] A. J. Shaka, J. Keeler, T. Frenkiel, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1983**, 52, 335.
- [12] C. Griesinger, G. Otting, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 7870.
- [13] A. A. Maudsley, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **1977**, 50, 368.
- [14] G. Bodenhausen, D. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 69, 185.
- [15] G. Otting, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **1988**, 76, 569.
- [16] a) D. Neuhaus, G. Wagner, M. Vasak, J. H. R. Kägi, K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem.* **1984**, 143, 659; b) N. Müller, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6482.
- [17] V. Sklenar, R. Tschudin, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1987**, 75, 352.
- [18] G. Otting, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 1871.
- [19] W. Bergmann, T. B. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, 55, 1733; M. Bolli, Diplomarbeit ETH, 1990.
- [20] J. A. Pople, W. G. Schneider, H. J. Bernstein, 'High-resolution Nuclear Magnetic Resonance', McGraw-Hill, New York, 1959, p. 218ff.
- [21] a) M. Guéron, M. Kochoyan, J. Leroy, *Nature* **1987**, 328, 89; b) D. H. Live, D. G. Davis, W. C. Agosta, D. Cowburn, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 1939.
- [22] P. P. Lankhorst, C. A. G. Haasnoot, C. Erkelens, C. Altona, *J. Biomol. Struct. Dynamics* **1984**, 1, 1387.
- [23] M. Billeter, M. Engeli, K. Wüthrich, *J. Mol. Graphics* **1985**, 3, 79.
- [24] C. Giessner-Prettre, B. Pullman, *J. Theor. Biol.* **1970**, 27, 87.
- [25] a) D. M. Cheng, R. H. Sarma, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 7333; b) M. H. Frey, W. Leupin, O. W. Sørensen, W. A. Denny, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biopolymers* **1985**, 24, 2371.
- [26] 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.
- [27] U. C. Singh, P. K. Weiner, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, AMBER 3.0, University of California, San Francisco, 1986; S. J. Weiner, P. A. Kollmann, D. T. Nguyen, D. A. Case, *J. Comp. Chem.* **1986**, 7, 230.
- [28] M. Billeter, T. Schaumann, W. Braun, K. Wüthrich, *Biopolymers* **1990**, 29, 695.
- [29] J. M. Withka, S. Swaminathan, J. Srinivasan, D. L. Besridge, P. H. Bolton, *Science* **1992**, 255, 597.
- [30] R. E. Dickerson, *Sci. Am.* **1983**, 249, 94.
- [31] D. H. Turner, M. Petersheim, D. D. Albergo, T. G. Deney, S. M. Freier, 'Biomolecular Stereodynamics I', Ed. R. H. Sarma, Adenine Press, New York, 1981, p. 429.