

Herausgeber: Im Auftrage der Chemischen Gesellschaft der Deutschen Demokratischen Republik

Prof. Dr. H. Dunken, Prof. Dr. L. Kolditz, Prof. Dr. E. Profft

Unter Mitarbeit von Prof. Dr. R. Geyer, Prof. Dr. S. Herzog, Prof. Dr. H.-A. Lehmann, Prof. Dr. S. Rapoport,

Prof. Dr. G. Rienäcker, Prof. Dr. G. Schott und Prof. Dr.-Ing. K. Schwabe

Infrarotspektroskopie und kernmagnetische Resonanz in der Nucleinsäureforschung

Von *Hartmut Fritzsche*

Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, DDR, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena, Abteilung Biophysikochemie

Einleitung

1. Verwendete experimentelle Methoden

1.1. Infrarotspektroskopie

1.2. Kernmagnetische Resonanz

2. Infrarotspektroskopische Untersuchungen von DNS aus Mikroorganismen

3. Verlustfreie Schnellmethode zur Bestimmung der Basenzusammensetzung der DNS

4. Konformationsänderungen der DNS im Gelzustand

4.1. Thermische Denaturierung der DNS

4.2. Säuredenaturierung der DNS

4.3. „Renaturierung“ der DNS

5. Wasserstoffisotopenaustausch

6. Wechselwirkung der DNS mit paramagnetischen divalenten Metallionen

6.1. Wechselwirkung der DNS und der Nucleoside mit Cu^{2+}

6.2. Wechselwirkung der DNS und der Nucleoside mit Mn^{2+}

7. Behinderte Rotation bei 5-Halogendesoxycytidinen

8. Zur Frage des Protonentunnels in der DNS

9. Weitere Untersuchungen (Literaturübersicht)

10. Ausblick

11. Zusammenfassung

Einleitung

Seit der Aufstellung des Doppelhelix-Modells der Desoxyribonucleinsäure (DNS) durch *Watson* und *Crick* und der Erkenntnis, in der DNS den Träger der genetischen Informationen gefunden zu haben, nimmt dieses Biopolymere eine zentrale Stellung in der molekularbiologischen Forschung ein. Schon frühzeitig wurden zum Studium der DNS die modernsten physikalischen und physikochemischen Untersuchungsmethoden eingesetzt. Viele der gebräuchlichsten Methoden (z. B. UV-Vis-Spektroskopie, ORD/CD, Viskosität, Sedimentation) gestatten zwar oft den Nachweis von Konformationsänderungen (Änderungen der Sekundär- oder Tertiärstruktur) der DNS, aber nur selten gelingen basenspezifische Aussagen oder noch detailliertere Lokalisationen bei Interaktionen der DNS mit biologisch aktiven Partnern (Pharmaka, Metallionen, Proteine). Nur wenige Methoden, wie die Röntgenstrukturanalyse, die Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie) und die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie), ermöglichen ein tieferes Eindringen in die „Feinstruktur“ der DNS und damit einen Einblick in die biologisch und medizinisch äußerst bedeutungsvollen Interaktionsmechanismen.

Dieser Beitrag beschäftigt sich mit der Anwendung der IR-Spektroskopie und der NMR-Spektroskopie in der DNS-Forschung, wobei Leistungsfähigkeit und Grenzen dieser beiden Methoden sowie der Vorteil des kombinierten Einsatzes an überwiegend eigenen Untersuchungsergebnissen demonstriert werden. Abschließend wird eine Übersicht über einige wichtige

neuere Arbeiten anderer Autoren gegeben, die durch den Einsatz dieser beiden spektroskopischen Methoden wesentliche Beiträge zur Struktur, Funktion und Wechselwirkungstendenz der Nucleinsäuren geliefert haben. Die älteren Arbeiten sind in den Übersichtsartikeln „Application of Infrared Spectroscopy to Structure Studies of Nucleic Acids“ von *T'suboi* [1], „Contributions of Nuclear Magnetic Resonance to the Study of the Structure and Electronic Aspects of Nucleic Acids“ von *T's'o* [2], „Nuclear Magnetic Resonance Studies on the Biochemistry of Biopolymers“ von *Roué* u. Mitarb. [3] und „Nuclear Magnetic Resonance in the Study of Biopolymers and their Interaction with Ions and Small Molecules“ von *Sheard* und *Bradbury* [3a] zusammengestellt.

1. Verwendete experimentelle Methoden

1.1. Infrarotspektroskopie

Die IR-Spektroskopie ist eine Methode zur Erfassung von Schwingungsvorgängen in Molekülen, woraus Erkenntnisse über Struktur und Elektronenverteilung in den Molekülen gewonnen werden können. Die Raman-Spektroskopie als Alternativmethode hat seit der Einführung des Lasers als Strahlungsquelle vor ungefähr sieben Jahren neue Anwendungsbereiche erschlossen und ist jetzt auch in der Nucleinsäureforschung wiederholt eingesetzt worden [4]–[6].

Der Hauptvorteil der Schwingungsspektroskopie beruht auf dem gruppenspezifischen Nachweis von Änderungen der Primär- oder Sekundärstruktur der Nucleinsäuren. Es kann also differenziert werden, welche Teile der DNS (Phosphatgruppen, Zuckerreste, Basenreste) bei Konformationsänderungen oder Interaktionen modifiziert werden, in günstigen Fällen ist sogar eine noch weitergehende Lokalisation mög-

lich. Bei Untersuchungen in wäßrigen Lösungen erweist sich die starke Strahlungsabsorption durch das Lösungsmittel als nachteilig; es werden höchste Anforderungen an die Energiereserve des verwendeten Infrarotspektralphotometers gestellt, die nur von den Hochleistungsgeräten der führenden Firmen auf diesem Gebiet erfüllt werden.

Für unsere Untersuchungen stand mit dem Infrarotspektralphotometer UR 10 (VEB Carl Zeiss Jena) nur ein Gerät der Mittelklasse zur Verfügung, das in dem Hauptuntersuchungsbereich ($1400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$) ein NaCl-Prisma mit relativ geringer Auflösung verwendet. Dadurch sind der Bearbeitung einiger Probleme Grenzen gesetzt, die nur gelegentlich durch Messungen in besser ausgestatteten Laboratorien überschritten werden konnten.

Die Untersuchungen an wäßrigen Lösungen der Nucleinsäuren oder ihrer Untereinheiten werden fast ausschließlich in D_2O durchgeführt, weil in dem Absorptionsgebiet der Schwingungen der Doppelbindungen ($1400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$), die ausschließlich von den Basenresten herrühren, H_2O sehr stark absorbiert. Nur zu Untersuchungen der Phosphatgruppenabsorption ($1200\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$) wird H_2O als Lösungsmittel eingesetzt.

Als wasserresistente Küvettenmaterialien stehen KRS-5, Arsensulfid und Calciumfluorid (Bezugsquelle: VEB Carl Zeiss Jena) sowie Bariumfluorid (RIIC London) zur Verfügung. Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurden fast ausschließlich Calciumfluoridscheiben mit einem Durchmesser von 30 mm verwendet. Teflonfolien mit entsprechenden Aussparungen dienen als Distanzringe, um Schichtdicken von 0,1 oder 0,05 mm zu erzielen. Aus Messing gearbeitete Fassungsstücke erlauben eine Adaptierung dieser Küvette an die Standard-Küvettenhalter vom VEB Carl Zeiss Jena.

Bei temperaturabhängigen Messungen befindet sich ein Kupfer-Konstantan-Thermoelement in einer seitlichen Bohrung des einen Calciumfluoridfensters. Die gesamte Küvette befindet sich in einem Thermostatenmantel [7], wie bereits an anderer Stelle beschrieben wurde [8]. Zur Kompensation der Lösungsmittelabsorption wird bei Raumtemperatur eine analoge, mit dem Lösungsmittel gefüllte Küvette und bei höheren Temperaturen zum Ausgleich der Dichteänderungen eine Küvette mit variabler Schichtdicke (Hersteller: VEB Carl Zeiss Jena) in den Vergleichsstrahlengang eingesetzt.

Aus konzentrierten hochviskosen Lösungen läßt sich die DNS zu einem dünnen Film ausstreichen. Eine bevorzugte Orientierung der DNS-Moleküle wird durch Ausstreichen in einer Richtung erreicht (Helixachsen bevorzugt in Streichrichtung) [9]. DNS-Filme mit reproduzierbarem und etwas höherem Orientierungsgrad lassen sich durch das Naßspinnverfahren herstellen [10], eine entsprechende Vorrichtung stand uns aber nicht zur Verfügung. Die infrarotspektroskopische Untersuchung der DNS-Filme, die auf den Calciumfluoridscheiben mit 30 mm Durchmesser aufgebracht werden, erfolgt in leicht abgeänderten Standard-Infrarotgasküvetten. Im Inneren dieser Küvette kann durch eine gesättigte Salzlösung, die sich in einem flachen Schiffchen auf dem Boden des Glaszylinders befindet, die gewünschte relative Feuchte eingestellt werden [11]. Durch Verwendung von D_2O statt H_2O zur Herstellung der gesättigten Salzlösungen kann der DNS-Film auch im deuterierten Zustand (Austausch aller NH- und OH-Protonen) untersucht werden [9]. Am Eintrittsfenster kann zusätzlich ein IR-Absorptionskantenfilter aus Indiumarsenid (Hersteller: Leitz Wetzlar) angebracht werden, das den größten Teil der von der IR-Strahlungsquelle ausgesandten Strahlung absorbiert und nur Strahlung unterhalb von 2600 cm^{-1} durchläßt; dadurch wird eine durch örtliche Aufheizung des DNS-Films mögliche partielle Austrocknung verhindert.

Zur Messung des IR-Dichroismus orientierter DNS-Filme wird der Selenfolieneinsatz des IR-Polarisators von VEB Carl Zeiss Jena [12] direkt vor dem Streulichtfilter (Vorzerleger) angebracht, wobei lediglich eine Rechteckblende

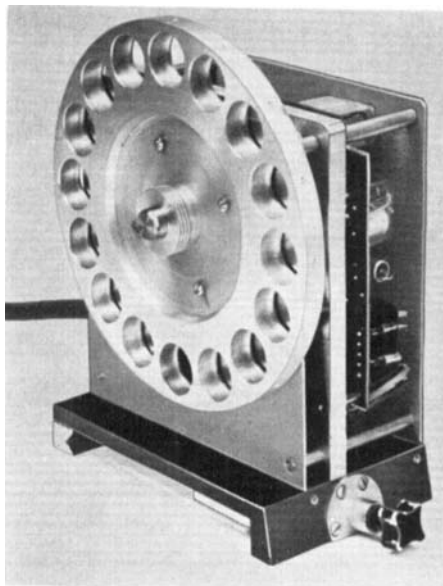


Bild 1

Automatischer Probenwechsler für das Infrarotspektralphotometer UR 10 (VEB Carl Zeiss Jena) bei entfernter Schutzhaube (nach *Fritzsche und Teutsch* [13])

entfernt werden muß; ein normaler Einsatz des Polarisators im Meßstrahlengang ist aus räumlichen Gründen nicht möglich und außerdem unvorteilhaft, da wellenzahlabhängige Intensitätsänderungen durch den Polarisator in das gemessene Spektrum eingehen, bei der von uns gewählten Anordnung aber durch gleichzeitige Polarisation des Meß- und Vergleichsstrahls eliminiert werden.

Untersuchungen an DNS-Bausteinen (Nucleosiden, Nucleotiden) werden teilweise auch im festen Zustand durchgeführt, wobei meist die konventionelle Preßtechnik (in KBr- oder KCl-Matrix) angewendet wird. Zur rationellen Auslastung des IR-Spektralphotometers ist dabei auch ein neu entwickelter automatischer Probenwechsler [13] eingesetzt worden (Bild 1).

Die infrarotspektroskopischen Untersuchungen an Filmen der DNS-Addukte setzten die Entwicklung einer neuen Präparationstechnik voraus. Beim direkten Zusammengeben der DNS und des Adduktpartners in höheren Konzentrationen wird die DNS oft ausgefällt. Das DNS-Addukt wird deshalb in verdünnter wäßriger Lösung durch Dialyse des (niedermolekularen) Adduktes in die DNS-Lösung hergestellt, anschließend — in Analogie zu den für die Röntgenstrukturanalyse der DNS-Farbstoff-Addukte verwendeten Präparationsmethoden [14], [15] — das DNS-Addukt durch Sedimentation in einer Ultrazentrifuge von der Lösung abgetrennt und zu einem Film ausgestrichen.

1.2. Kernmagnetische Resonanzspektroskopie

Die NMR-Spektroskopie erfaßt Kernspinorientierungsvorgänge. Aus der chemischen Verschiebung der Resonanzsignale können Aussagen über die Elektronendichteverteilung an dem untersuchten Kern abgeleitet werden. Die durch Kernspin-Kernspin-Kopplungen verursachten Signalaufspaltungen geben Aufschluß über Art und Anzahl der benachbarten Kerne, während die Breite des Resonanzsignals von den Relaxationsprozessen bestimmt wird und dadurch eine Beobachtung von Austauschprozessen, Beweglichkeitseinschränkungen, kinetischen Prozessen und den Einflüssen paramagnetischer Substanzen gestattet. Somit liefert die NMR-Spektroskopie einzigartige Informationen, wobei im günstigsten Fall bei Wechselwirkungen oder anderen Modifikationen direkt der Angriffsort lokalisiert werden kann. Die Anwendung der NMR-Spektroskopie wird erheblich eingeschränkt durch die benötigten hohen Konzentrationen (bei

einem 60-MHz-Gerät soll die Konzentration möglichst über 0,1 molar sein) und durch die fehlende Möglichkeit des Nachweises der Resonanzabsorption von DNS, da die eingeschränkte Beweglichkeit allgemein bei Biopolymeren zu einer so starken Verbreiterung der Signale führt, daß deren Beobachtung nicht mehr möglich ist [16]. Durch den Einsatz von Spektrenakkumulatoren (time average computer) und Verwendung höherer Magnetfeldstärken (100 bzw. 220 MHz) können auch noch NMR-Spektren von Lösungen mit relativ geringer Konzentration erhalten werden. Die zweite genannte Einschränkung für den Einsatz der NMR-Spektroskopie wird ausgenutzt, indem Änderungen im NMR-Spektrum eines niedermolekularen Adduktpartners bei steigendem Zusatz des durch keine eigenen Resonanzsignale störenden Biopolymeren verfolgt werden können. Mit dieser Methode sind aus den Signalverbreiterungen bei der Adduktbildung z. B. genaue Aufschlüsse über die Anheftungsstelle von Antibiotika an globuläre Proteine gewonnen worden [17].

Sehr wichtig ist auch die Möglichkeit, durch Kombination mit der IR-Spektroskopie auf der Stufe der Monomeren (Nucleoside, Nucleotide) oder Oligomeren mittels der NMR-Spektroskopie gewonnenen Resultate auf die nur noch der IR-Spektroskopie zugänglichen Stufe der DNS zu übertragen (ein Beispiel dieser Kombination wird im Abschn. 6.1. gegeben).

Die hier beschriebenen kernresonanzspektroskopischen Untersuchungen wurden an einem 60-MHz-Gerät ZKR 60 (VEB Carl Zeiss Jena) durchgeführt. In einigen Fällen wurde das Signal-Rausch-Verhältnis durch einen Spektrenakkumulator Spectrostore SPT-1 (Akademie-Werkstätten für Forschungsbedarf Berlin), der über eine spezielle Anpassungseinheit mit dem Kernresonanzspektrometer verbunden ist, verbessert.

Als Lösungsmittel wurden D₂O (Isotopenreinheit 99,8%) und Dimethylsulfoxid-D₆ (Isotopenreinheit 99,2%) eingesetzt; als (interner) Standard für die wäßrigen Lösungen dienten DSS [Na-Salz der 3-(Trimethylsilyl)-propan-sulfonsäure] und (CH₃)₃SiCD₂CD₂COONa, beides kommerzielle Produkte der Merck A.-G.; für die DMSO-Lösungen diente Tetramethylsilan (TMS) als (interner) Standard.

Temperaturabhängige Messungen wurden an einem Varian-100-MHz-Gerät bei der Sektion Physik der Karl-Marx-Universität Leipzig durchgeführt, als Standard diente Hexamethyldisilan.

2. Infrarotspektroskopische Untersuchungen von DNS aus Mikroorganismen

Als 1963 die infrarotspektroskopischen Untersuchungen an DNS in unserem Institut begonnen wurden, waren von anderen Arbeitsgruppen nur aus höheren Organismen isolierte DNS-Präparate (Kalbsthymus, Fischsperma) untersucht worden [9], [18]; die DNS höherer Organismen zeichnet sich durch eine einheitliche Basenzusammensetzung von etwa 40 Mol-% G + C (komplementäre Guanin-Cytosin-Basenpaare) und entsprechend etwa 60 Mol-% A + T (Adenin-Thymin-Basenpaare) aus. Dagegen variiert die Basen-

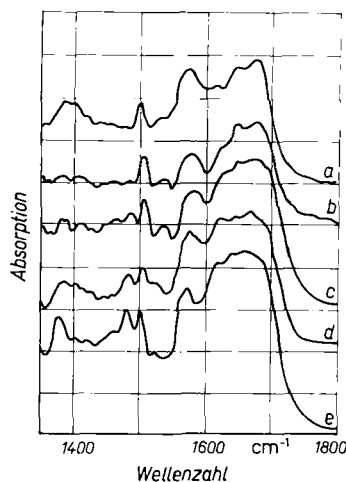


Bild 2
IR-Spektren deuterierter DNS-Filme (D₂O-Atmosphäre von 86% relativer Feuchte): a) DNS aus *Streptosporangium roseum*, 72 Mol-% (G + C); b) DNS aus *Rhodospirillum rubrum*, 60 Mol-% (G + C); c) DNS aus *Thermactinomyces vulgaris*, 52 Mol-% (G + C); d) DNS aus *Proteus mirabilis*, 42 Mol-% (G + C); e) DNS aus *Clostridium paraputrificum*, 27 Mol-% (G + C) [20]

zusammensetzung der in unserem Institut isolierten DNS aus Mikroorganismen von 28 Mol-% G + C bis zu 72 Mol-% G + C. Es interessiert zunächst die Frage, ob sich diese großen Unterschiede in der Basenzusammensetzung der DNS-Proben auch in deren IR-Spektren widerspiegeln. Charakteristische Unterschiede in den IR-Spektren von DNS mit hohem (G + C)-Gehalt einerseits und hohem (A + T)-Gehalt [gleichbedeutend mit niederem (G + C)-Gehalt] andererseits könnten zusammen mit den IR-Spektren der Bausteine (Nucleoside = Base + Zucker; Nucleotide = Base + Zucker + Phosphat) Zuordnungsmöglichkeiten von IR-Absorptionsbanden der DNS zu einer der vier Basen ergeben. Damit wäre dann die äußerst wichtige Möglichkeit, Modifizierungen oder Interaktionen der DNS basenspezifisch zu lokalisieren, durch die IR-Spektroskopie prinzipiell erschließbar.

Schon die ersten orientierenden Untersuchungen an deuterierten DNS-Filmen (bei 86% relativer Feuchte) ergaben in Abhängigkeit vom (G + C)-Gehalt deutlich ausgeprägte Differenzen der IR-Spektren zwischen 1400 und 1700 cm⁻¹ [19], [20] (Bild 2). Zum Vergleich wurden die IR-Spektren der Nucleoside, der synthetischen Polynucleotide sowie der Abbauprodukte Apurinsäure (enthält nur noch die Basen Thymin und Cytosin) und Apyrimidinsäure (enthält nur noch die Basen Guanin und Adenin) herangezogen; sie erlauben folgende Zuordnungen von IR-Absorptionsbanden der DNS zu bestimmten Basenresten

Substanz (Zustand)	Wellenzahl des Absorptionsmaximums (in cm ⁻¹)					
Cytidin (D ₂ O-Lösung)	1504 (s)	1527 (sh)	1582 (m)	1615 (m)	1652 (ss)	
Cytidin (Nujol)*	1500 (s)	1525 (sh)		1615 (sh)	1640 (ss)	
Guanosin (D ₂ O-Lösung)		1568 (sh)	1578 (ss)		1665 (ss)	
Guanosin (Nujol)*		1551 (ss)		1568 (w)	1712 (m)	
Adenosin (D ₂ O-Lösung)	1484 (m)		1578 (m)	1627 (ss)		
Adenosin (Nujol)*	1480 (s)	1520 (w)	1575 (m)	1627 (ss)		
Thymin (D ₂ O-Lösung)	1482 (s)		1634 (ss)	1663 (ss)	1688 (sh)	
Polycytidylsäure** (Film)	1503 (s)	1525 (sh)		1610 (sh)	1650 (ss)	
Polyadenylsäure** (Film)	1480 (s)			1620 (ss)		
Polyguanylsäure*** (Film)			1587 (m)		1672 (ss)	
Apurinsäure (D ₂ O-Lösung)	1480 (m)	1508 (m)	1634 (sh)	1662 (ss)	1683 (sh)	
Apyrimidinsäure (D ₂ O-Lösung)	1483 (m)	1582 (m)	1629 (s)	1669 (ss)		

Tabelle 1

IR-Absorptionsmaxima von Nucleosiden und Polynucleotiden im Wellenzahlbereich von 1450–1800 cm⁻¹ (alle Substanzen in deuterierter Form) [20]

Intensitätsklassifizierung: sehr stark (ss), stark (s), mittel (m), schwach (w), Schulter (sh).

*) Daten von Tsuboi u. Mitarb. [21]

**) Daten von Tsuboi [22]

*** Daten von Miles und Frazier [23]

[20] (Tab. 1): Adenin und Thymin bei 1485 cm^{-1} , Cytosin bei 1505 cm^{-1} , Guanin bei 1575 cm^{-1} . Diese Zuordnungen wurden durch Untersuchungen von Tsuboi u. Mitarb. bestätigt [1], [24]. Die IR-Absorptionsmaxima im Bereich der stärksten Absorption zwischen 1600 und 1700 cm^{-1} sind stark von der Sekundärstruktur der DNS abhängig, weswegen dieser Bereich zunächst für basenspezifische Untersuchungen ungeeignet erschien. Aber gerade der hohe Informationsgehalt dieses Spektralbereiches über die Sekundärstruktur ist in jüngster Zeit von verschiedenen Autoren für Aussagen über die Art und Anzahl der komplementären Basenpaarungen in Ribonucleinsäuren genutzt worden und dabei wieder speziell zur Bestätigung des sog. „Kleeblattmodells“ der t-RNS (Transfer-Ribonucleinsäure). Es können auch Entscheidungen über die Richtigkeit von Modellen über die Tertiärstruktur der t-RNS, die zusätzliche komplementäre Basenpaarungen fordern, getroffen werden [1], [25].

3. Verlustfreie Schnellmethode zur Bestimmung der Basenzusammensetzung der DNS

Die im vorangegangenen Abschnitt getroffenen Zuordnungen einiger IR-Absorptionsbanden deuterierter DNS-Filme zu bestimmten Basenresten bilden einerseits die Grundlagen für basenspezifische Interaktionsstudien an der DNS, andererseits wird dadurch auch die Möglichkeit eröffnet, die mit dem (G + C)-Gehalt der DNS variierende Intensität einiger IR-Absorptionsbanden zur quantitativen Bestimmung der Basenzusammensetzung auszunutzen.

Tabelle 2

Intensitätsverhältnis E_{1485}/E_{1505} der bei 1485 cm^{-1} und 1505 cm^{-1} gemessenen Extinktionen in den IR-Spektren von DNS aus Mikroorganismen [20]

DNS aus	(G + C)-Gehalt in Mol-%	E_{1485}/E_{1505}
<i>Streptosporangium roseum</i>	72*)	0,050
<i>Streptomyces chrysomallus</i>	72*)	0,052
<i>Nocardia turbata</i>	72**)	0,042
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	60**)	0,090
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	52**)	0,270
<i>Escherichia coli</i>	50*)	0,312
<i>Bacillus subtilis</i>	43*)	0,392
<i>Proteus mirabilis</i>	42*)	0,441
T2-Phagen	34**)	0,692
<i>Clostridium paraputrificum</i>	27**)	1,045

*) ermittelt durch Säurehydrolyse und chromatographische Trennung
 **) ermittelt durch Messung der „Schmelztemperatur“ T_m der DNS aus der UV-Hyperchromie

Als besonders geeignet erscheinen die IR-Absorptionsdaten bei 1485 cm^{-1} und 1505 cm^{-1} . In Tab. 2 sind die Extinktionswerte dieser beiden Absorptionsmaxima für einige DNS-Präparate aus verschiedenen Mikroorganismen zusammengestellt. Die Basenzusammensetzung dieser DNS-Proben wurde in der Abteilung Biochemie unseres Instituts nach klassischen Verfahren (entweder hydrolytischer Abbau der DNS und dünnschichtchromatographische Trennung der Basen oder ultraviolett-spektroskopische Bestimmung der DNS-Schmelztemperatur T_m) bestimmt. Die Schwierigkeit, DNS-Filme reproduzierbarer Schichtdicke für die IR-Spektroskopie herzustellen, wird durch die Bildung des Extinktionsquotienten E_{1485}/E_{1505} umgangen.

¹⁾ Tsuboi u. Mitarb. fanden in H_2O -Lösungen im Bereich von 1200 bis 1350 cm^{-1} ebenfalls IR-Absorptionsbanden der DNS, deren Intensitäten mit dem (G + C)-Gehalt korrelierbar sind [24].

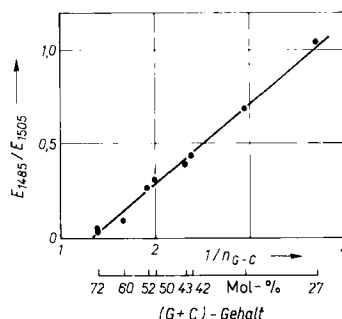


Bild 3

Intensitätsverhältnis E_{1485}/E_{1505} der bei 1485 cm^{-1} und 1505 cm^{-1} gemessenen Extinktionen als Funktion von $1/n_{G-C}$ ($100n_{G-C}$ = (G + C)-Gehalt in Mol-%). Die eingezeichnete Gerade resultiert aus der Behandlung der für einige DNS-Proben gemessenen Daten (Tab. 2) nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate [20], [27].

Falls die im vorhergehenden Abschnitt getroffenen Zuordnungen korrekt sind, sollten nach dem Lambert-Beerschen Gesetz folgende Beziehungen gelten:

$$n_{A-T} = (E_{1485}/\epsilon_{1485}) c_0 d \quad (1)$$

$$n_{G-C} = (E_{1505}/\epsilon_{1505}) c_0 d \quad (2)$$

n_{G-C} und n_{A-T} sind die Bruchteile der G + C- bzw. A + T-Basenpaare in der DNS, für die Summe beider gilt:

$$n_{G-C} + n_{A-T} = 1 \quad (3)$$

Kombination der Gln. (1)–(3) ergibt Gleichung (4):

$$E_{1485}/E_{1505} = (\epsilon_{1485}/\epsilon_{1505})(1/n_{G-C}) - (\epsilon_{1485}/\epsilon_{1505}) \quad (4)$$

Demzufolge sollte der Extinktionsquotient E_{1485}/E_{1505} linear von $1/n_{G-C}$ abhängen. Experimentell wurde für die in Tab. 2 aufgeführten DNS-Präparate tatsächlich dieser lineare Zusammenhang gefunden (Bild 3); für die experimentellen Werte ergibt sich nach der Methode der kleinsten Quadrate die Gleichung

$$E_{1485}/E_{1505} = 0,429 (1/n_{G-C}) - 0,568 \quad (5)$$

Die beiden Faktoren 0,429 und 0,568 sollten eigentlich nach Gl. (4) den gleichen Zahlenwert haben, die Abweichungen resultieren wahrscheinlich aus dem angewandten Grundlinienverfahren [26] zur Ermittlung der Extinktionswerte.

Die Gl. (5) kann als Eichkurve verwendet werden, um die Basenzusammensetzung von erstmals isolierten DNS-Proben aus Mikroorganismen zu bestimmen [27]. Die Basenzusammensetzung der DNS ist oft zur Klärung von Fragen der Evolution und der Taxonomie eingesetzt worden [28]. Die Genauigkeit der IR-Methode ist vor allem im Bereich mittleren und niedrigen (G + C)-Gehalts groß und fällt innerhalb von 2% mit den in Tab. 2 angeführten Vergleichswerten zusammen.

Hauptvorteile der IR-Methode sind:

- geringer Zeitbedarf; Präparation (von fester DNS ausgehend) des Films, Aufnahme des IR-Spektrums und Auswertung benötigen etwa 30–40 Minuten;
- verlustfreies Arbeiten; im Gegensatz zu den beiden genannten klassischen Verfahren zur Bestimmung der Basenzusammensetzung bleibt die untersuchte DNS im nativen Zustand. Es ist deshalb möglich, bei nur geringen zur Verfügung stehen-

den Mengen an DNS die Untersuchungssubstanz noch für weitere Experimente zu verwenden.

Durch die Möglichkeit der verlustfreien Rückgewinnung der DNS ist die benötigte Substanzmenge von mindestens 2 mg meist verfügbar; durch Verwendung eines üblichen Strahlenkondensors kann die Basenzusammensetzung bereits an 0,2 mg DNS gemessen werden, zur Vermeidung örtlicher Erwärmung muß allerdings das bereits im Abschnitt 1.1. erwähnte Indiumarsenidfilter vorgeschaltet werden.

Diese infrarotspektroskopische Methode zur Bestimmung der DNS-Basenzusammensetzung hat seither praktische Anwendung zur Charakterisierung neu isolierter DNS-Proben gefunden. Für die erstmals in unserem Institut isolierte DNS aus *Thermoactinomyces vulgaris* wurden mit der IR-Methode 52 Mol-% G + C ermittelt; übereinstimmend damit ergab die optische T_m -Bestimmung ebenfalls 52 Mol-% G + C [29]. Dieselbe ausgezeichnete Übereinstimmung mit den anderen zeitaufwendigeren bzw. substanzzerstörenden Bestimmungsmethoden ergab sich auch bei der Analyse der DNS aus Zymosarcinen [30] (Tab. 3).

Tabelle 3
Vergleich des nach verschiedenen Methoden bestimmten (G + C)-Gehalts der DNS aus Zymosarcinen (aus [30])

Methode	(G + C)-Gehalt in Mol-%	
	Sarcina maxima	Sarcina ventriculi
Dünnschichtchromatographie	29,5	30,5
T_m (UV-Hyperchromie)	29	28
IR-Schnellmethode	29	30

Die IR-Methode zur Bestimmung der DNS-Basenzusammensetzung arbeitet demzufolge hinreichend genau und dabei verlustfrei bzw. wesentlich rascher als die üblicherweise verwendeten Verfahren.

4. Konformationsänderungen der DNS im Gelzustand

4.1. Thermische Denaturierung der DNS

Die meisten physikochemischen Untersuchungen an DNS wurden in stark verdünnten wäßrigen Lösungen durchgeführt. *In vivo* liegt aber die DNS in der Zelle in hoher örtlicher Konzentration vor. Über die Eigenschaften der DNS *in vivo* liegen nur wenige Untersuchungen vor. Insbesondere ist es von großer biologischer Bedeutung, den Verlust oder Änderungen der Sekundärstruktur der DNS in diesem hochkonzentrierten Zustand in Abhängigkeit von bestimmten Parametern (vor allem Temperatur, pH, Salzgehalt) verfolgen zu können. Die Infrarotspektroskopie vermag hierzu einen entscheidenden Beitrag zu leisten. Wegen der im Vergleich zur UV-Spektroskopie niedrigen molaren Extinktionskoeffizienten können infrarotspektroskopisch noch 10%ige Lösungen bei Schichtdicken von 0,05 mm untersucht werden.

Bereits 1961 hatten Kyogoku u. Mitarb. nachgewiesen, daß der Verlust der Sekundärstruktur beim Erhitzen von DNS-Lösungen (thermische Denaturierung) infrarotspektroskopisch verfolgt werden kann [31]. Es wird dabei das Anwachsen der Extinktion bei etwa 1660 cm^{-1} (Absorptionsmaximum der DNS im thermisch denaturierten Zustand) relativ zur Extinktionsabnahme bei etwa 1685 cm^{-1} (Absorptionsmaximum der DNS im nativen Zustand) bei steigender

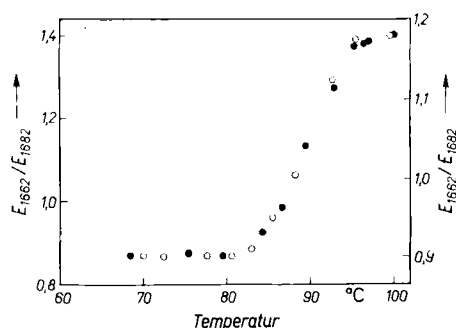


Bild 4
Thermische Denaturierung von Kalbsthymus-DNS in hochkonzentrierter D_2O -Lösung. Ordinate: Verhältnis der Extinktionen bei 1662 cm^{-1} und 1682 cm^{-1} . Von den aufgetragenen zwei Messungen beziehen sich die ausgefüllten Kreise auf den linken, die unausgefüllten Kreise auf den rechten Ordinatenmaßstab [32].

Temperatur zur Charakterisierung des Übergangs der DNS vom geordneten Zustand (helix) zum ungeordneten Zustand (coil) benutzt. Die in der zitierten Arbeit [31] veröffentlichten Daten ließen wegen der geringen Anzahl der Meßpunkte und deren großen Streuung Zweifel aufkommen, ob diese infrarotspektroskopische Methode eine einigermaßen genaue Bestimmung der Schmelztemperatur T_m (Temperatur, bei der 50% der DNS denaturiert sind) und der Übergangsbreite ΔT_m (Temperaturintervall zwischen 25% und 75% Denaturierung) erlaubt. Wir haben deshalb Untersuchungen an Kalbsthymus-DNS durchgeführt, wobei die Eignung der infrarotspektroskopischen Methode zur Messung des Verlaufs der thermischen Denaturierung von hochkonzentrierten DNS-Lösungen im Gelzustand mit hoher Präzision und Reproduzierbarkeit nachgewiesen wurde [32]. An zwei willkürlich herausgegriffenen Denaturierungskurven (Extinktionsquotient $1662\text{ cm}^{-1}/1682\text{ cm}^{-1}$ über der Temperatur aufgetragen) sei die erreichte Genauigkeit demonstriert (Bild 4): Die Schmelztemperaturen (T_m) beider Kurven differieren um 0,3 grd und stimmen somit innerhalb der Fehlergrenze der Meßmethode (etwa 0,5 grd) überein. Ebenso gut ist die Übereinstimmung der Übergangsbreiten ΔT_m , die 5,8 bzw. 5,5 grd betragen. Der so geführte Nachweis über die Möglichkeit der infrarotspektroskopischen Verfolgung von Sekundärstrukturänderungen konzentrierter Nucleinsäurelösungen regte andere Arbeitsgruppen an, mit dieser Methodik lösliche RNS aus Gehirntumoren [33], RNS-Farbstoffkomplexe [34] und neuerdings mit Differenzspektroskopie (unter Benutzung von nur 1%igen Lösungen in D_2O) DNS [35], [36] zu untersuchen.

Nachdem durch diese Vorarbeit eine prinzipielle Eignung der IR-Spektroskopie zur Verfolgung der thermischen Denaturierung und zur exakten Messung der Parameter T_m und ΔT_m von DNS im Gelzustand erwiesen war, wurde nun die thermische Denaturierung von DNS-Proben aus verschiedenen Mikroorganismen untersucht [37]. Die IR-Spektren der thermischen Denaturierung von DNS aus Mikroorganismen seien durch je einen Vertreter aus der Gruppe mit hohem (G + C)-Gehalt, mit mittlerem (G + C)-Gehalt und mit hohem (A + T)-Gehalt charakterisiert: DNS aus *Micrococcus lysodeikticus* (72 Mol-% G + C) zeigt im IR-Spektrum im Verlauf der thermischen Denaturierung eine Verschiebung des Haupt-

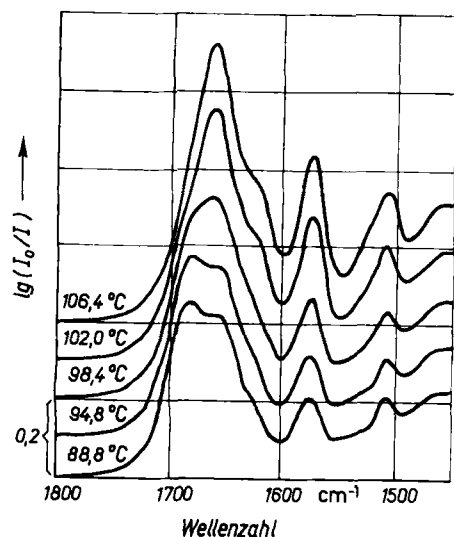


Bild 5
Änderungen des IR-Spektrums der DNS aus *Micrococcus lysodeikticus* bei der thermischen Denaturierung in D_2O -Lösung

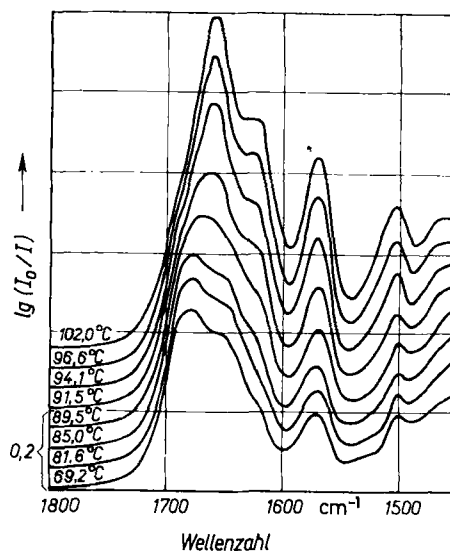


Bild 6
Änderungen des IR-Spektrums der DNS aus *Escherichia coli* bei der thermischen Denaturierung in D_2O -Lösung

absorptionsmaximums von 1685 cm^{-1} zu 1665 cm^{-1} (Bild 5); eine Schulter geringer Intensität zeigt sich bei etwa 1625 cm^{-1} im IR-Spektrum der denaturierten Form; die IR-Absorptionsmaxima bei 1575 und 1508 cm^{-1} verschieben sich bei der Denaturierung nicht.

Im IR-Spektrum der DNS aus *Escherichia coli* (50 Mol-% G + C) verlagert sich das Hauptabsorptionsmaximum bei der thermischen Denaturierung von 1690 cm^{-1} zu 1665 cm^{-1} . Die Absorptionsbande der denaturierten Form bei 1625 cm^{-1} tritt hier deutlicher hervor als bei der DNS mit hohem (G + C)-Gehalt (Bild 6).

Dieses IR-Absorptionsmaximum der denaturierten DNS ist bei DNS mit hohem (A + T)-Gehalt, z. B. bei DNS aus *Sarcina maxima* (29 Mol-% G + C), bereits von mittlerer Intensität (Bild 7). Es besteht also ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem (A + T)-Gehalt und der Intensität des IR-Absorptionsmaximums bei 1625 cm^{-1} der denaturierten DNS.

Alle untersuchten DNS-Proben aus Mikroorganismen zeigen unabhängig von ihrem (G + C)-Gehalt die charakteristische Verschiebung des Hauptabsorptionsmaximums von etwa 1685 cm^{-1} in der nativen Form zu etwa 1665 cm^{-1} in der denaturierten Form. Die bereits beschriebene Form der Auftragung des Extinktionsquotienten E_{1665}/E_{1685} (gemessen bei den jeweiligen Wellenzahlen der IR-Absorptionsmaxima der denaturierten bzw. nativen DNS) über der Temperatur ergibt charakteristische „Schmelzkurven“ für den Verlauf der thermischen Denaturierung der DNS im Gelzustand, analog zu den bekannten Darstellungen der UV-Hyperchromie von verdünnten DNS-Lösungen in Abhängigkeit von der Temperatur. Die aus den IR-Spektren der Bilder 5, 6 und 7 sowie der DNS aus *Clostridium paraputrificum* (28 Mol-% G + C) gewonnenen Schmelzkurven sind in Bild 8 dargestellt [38]. Die daraus ermittelten Schmelztemperaturen T_m für sechs DNS-Präparate aus Mikroorganismen und für Kalbsthymus-DNS sind in Tab. 4 zusammengestellt. Der mittlere Fehler der T_m -Werte (bei verschiedenen DNS-Präparationen aus dem gleichen Mikroorganismus) beträgt $\pm 1 \text{ grad}$.

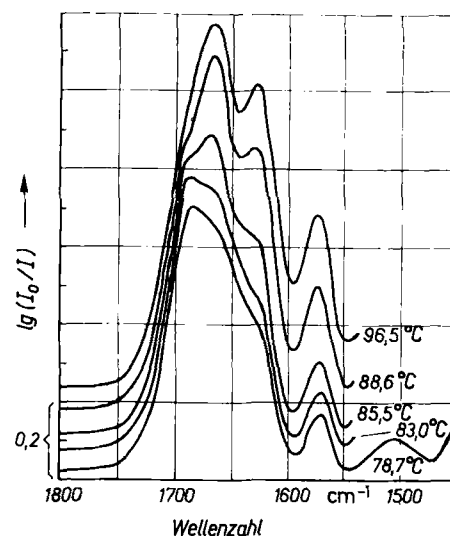


Bild 7
Änderungen des IR-Spektrums der DNS aus *Sarcina maxima* bei der thermischen Denaturierung in D_2O -Lösung

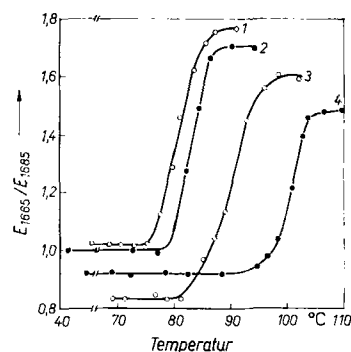


Bild 8
Schmelzkurven verschiedener DNS-Proben, gewonnen durch Auftragung des Intensitätsverhältnisses E_{1665}/E_{1685} über der Temperatur: 1 DNS aus *Clostridium paraputrificum*, 2 DNS aus *Sarcina maxima*, 3 DNS aus *Escherichia coli*, 4 DNS aus *Micrococcus lysodeikticus*

Tabelle 4
Infrarotspektroskopisch ermittelte Schmelztemperaturen T_m einiger DNS-Proben mit unterschiedlichem (G + C)-Gehalt [38]

DNS aus	(G + C)-Gehalt in Mol.-%	T_m in °C
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	72	100,5
<i>Streptosporangium roseum</i>	72	99,5
<i>Escherichia coli</i>	50	90,0
Kalbsthymus	41	86,2
T2-Phage	34	86,1
		86,8*)
<i>Sarcina maxima</i>	29	82,8
		82,4*)
<i>Clostridium paraputrificum</i>	28	80,6

*) Schmelzkurve durch Auftragung der Extinktion bei 1625 cm^{-1} über der Temperatur (s. Text)

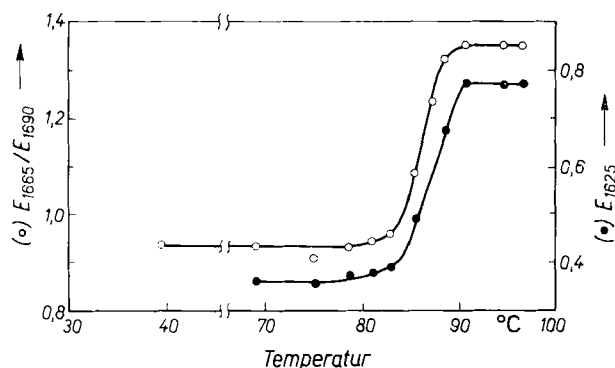


Bild 9
Schmelzkurven der DNS aus T2-Phagen; a) Verhältnis E_{1665}/E_{1685} der Extinktionen bei 1665 cm^{-1} und 1685 cm^{-1} über der Temperatur aufgetragen (○, linke Ordinate); b) Extinktion bei 1625 cm^{-1} über der Temperatur aufgetragen (●, rechte Ordinate)

Bei DNS mit mittlerem und niederem (G + C)-Gehalt läßt sich durch Auftragen der Extinktion bei 1625 cm^{-1} über der Temperatur ebenfalls eine Schmelzkurve gewinnen, wie in Bild 9 am Beispiel der DNS aus T2-Phagen gezeigt wird [38]. Die so ermittelten T_m -Werte sind in die Tab. 4 mit aufgenommen worden und stimmen innerhalb der Fehlergrenze mit den aus dem Extinktionsquotienten E_{1665}/E_{1685} erhaltenen Werten überein. Somit bieten die Infrarotspektren von DNS mit nicht zu geringem (A + T)-Gehalt zwei unabhängige Möglichkeiten zur Messung der Schmelztemperatur T_m .

Die infrarotspektroskopisch ermittelten Schmelztemperaturen der DNS wachsen mit zunehmendem (G + C)-Gehalt an (Tab. 4). Bereits 1962 wurde von Marmur und Doty für verdünnte DNS-Lösungen in einem Standardpuffer (0,15 m NaCl und 0,015 m Na-Citrat) ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Größen in der Form $T_m = 69,3 + 0,41 (G + C)$ gefunden [39]. Die infrarotspektroskopisch ermittelten Schmelztemperaturen hochkonzentrierter DNS-Lösungen (Tab. 4) ergeben ebenfalls eine Gerade der Form $T_m = 70,3 + 0,41 (G + C)$ (Bild 10) [38]. Die Steigung von 0,41 ist in beiden Fällen (und bei verdünnten DNS-Lösungen auch für andere Puffersysteme [39]) gleich; offensichtlich wird dieser Wert durch die beim Schmelzen der (G + C)-Basenpaare zusätzlich — gegenüber den (A + T)-Basenpaaren — aufzuwendende Schmelzenthalpie bestimmt. Dagegen hängt der Achsenabschnitt von der freien Energie des Schmelzprozesses ab (die T_m -Werte stellen ja die Temperaturen dar, bei denen die freie Energie der thermischen Denaturierung gerade Null ist) und

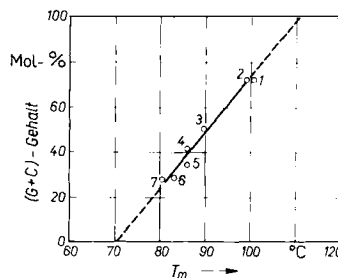


Bild 10
Beziehung zwischen den infrarotspektroskopisch gemessenen Schmelztemperaturen T_m und dem (G + C)-Gehalt einiger DNS-Proben

nimmt daher mit sich änderndem Milieu verschiedene Werte an.

Mit Hilfe der gefundenen Beziehung zwischen T_m und (G + C)-Gehalt der DNS können übrigens auch aus den IR-Daten — analog zu der üblichen ultravioletspektroskopischen Bestimmungsmethode [39] — Basenzusammensetzungen neu isolierter DNS-Proben ermittelt werden. So ergibt sich infrarotspektroskopisch für die bereits erwähnte DNS aus *Thermoactinomyces vulgaris* ein Schmelzpunkt $T_m = 92^\circ\text{C}$. Das entspricht nach der angegebenen Beziehung einem (G + C)-Gehalt von 53 Mol.-%, in guter Übereinstimmung mit den 52 Mol.-%, die sich sowohl nach der ultravioletspektroskopischen Methode [29] als auch nach der infrarotspektroskopischen Schnellmethode ergeben hatten.

Somit ergibt sich, daß die in verdünnter wäßriger Lösung gefundene Stabilisierung der Sekundärstruktur der DNS mit wachsendem Anteil der (G + C)-Basenpaare auch in hochkonzentrierter DNS-Lösung von Gelcharakter und somit sicher auch *in vivo* existiert.

4.2. Säuredenaturierung der DNS

Bei Zusatz von DCl zu den hochkonzentrierten DNS-Lösungen in D_2O denaturiert die DNS, im Gegensatz zur thermischen Denaturierung tritt dabei im IR-Spektrum auch von DNS mit hohem (A + T)-Gehalt keine neue Absorptionsbande bei 1625 cm^{-1} auf (Bild 11). Auf den Zusammenhang zwischen der Intensität dieser Bande in denaturierter DNS und dem Anteil der (A + T)-Basenpaare wurde bereits im Abschn. 4.1. hingewiesen. Das Nichtauftreten dieser IR-Absorption bei 1625 cm^{-1} bei der Säuredenaturierung läßt einen Zusammenhang mit der Proto-

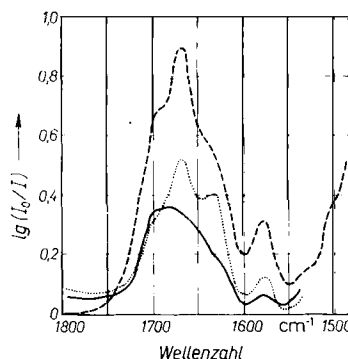


Bild 11
IR-Spektren der DNS aus *Clostridium paraputrificum* in D_2O -Lösung: native DNS; DNS nach thermischer Denaturierung; ---- DNS nach Säuredenaturierung

nisierung der Adenin- oder Thyminreste der DNS vermuten; nach den pK-Werten der Basen sollte dafür nur Adenin in Betracht kommen. Auch im IR-Spektrum der Apyrimidinsäure (frei von Thymin!) ist in 1/100 n DCl die entsprechende Absorptionsbande fast vollständig verschwunden. Ein weiterer Beweis für die Zuordnung der Absorptionsbande bei 1625cm^{-1} zum Adeninrest der (denaturierten) DNS wird von Tsuboi geliefert [22]: Demzufolge verschwindet auch in Polyadenylsäure bei Protonierung der Adeninreste am N-3 die IR-Absorptionsbande bei 1625cm^{-1} . Offensichtlich ist die Intensität dieser Absorptionsbande durch die geordnete Doppelhelixstruktur stark vermindert, denn in nativer DNS ist selbst bei hohem Anteil an (A + T)-Basenpaaren kein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 1625cm^{-1} zu beobachten (Bild 7). In denaturierter DNS ist dieses Maximum aber von mittlerer Intensität, so daß eine Intensitätsminderung oder ein Fehlen des IR-Absorptionsmaximums als Nachweis für den Protonisierungsgrad der Adeninreste in der DNS genutzt werden kann. Neben der Säuredenaturierung der DNS in Lösung wurde auch die Säuredenaturierung eines orientierten DNS-Films durch gasförmiges DCl infrarotspektroskopisch untersucht. Der Infrarotdichroismus im Bereich des Hauptabsorptionsmaximums bei 1680cm^{-1} nativer DNS verschwindet bei der Säuredenaturierung völlig (Bild 12). Demzufolge sind die Basenreste der säuredenaturierten DNS bezüglich der Helixachse ohne bevorzugte Orientierung. Die Protonisierung der auf einer Unterlage fest fixierten DNS-Moleküle bewirkt deshalb nicht nur die zu erwartende Aufhebung der komplementären (horizontalen) Basenpaarung, sondern auch die völlige Aufhebung der (vertikalen) Basenstapelung.

4.3. „Renaturierung“ der DNS

Bei langsamer Abkühlung von thermisch denaturierten DNS-Lösungen kann eine Renaturierung erfolgen, indem alle komplementären Basen wieder die spezifische Basenpaarung über Wasserstoffbrücken

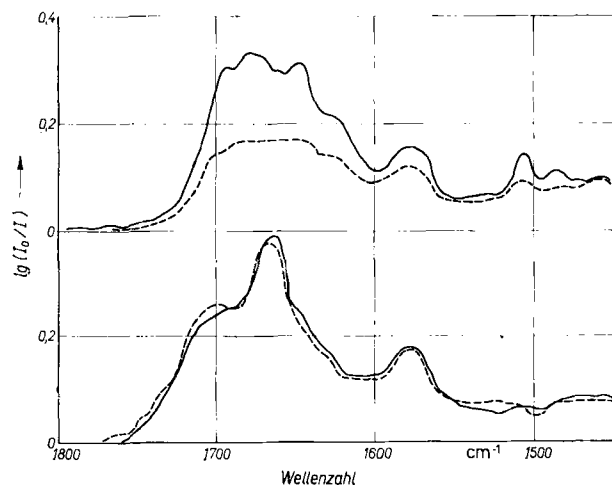


Bild 12
IR-Spektren orientierter Kalbsthymus-DNS-Filme (in D_2O -Atmosphäre von 86% relativer Feuchte) unter Verwendung polarisierter IR-Strahlung; oberes Spektrum: native DNS; unteres Spektrum: derselbe DNS-Film nach Säuredenaturierung durch kurze Einwirkung von gasförmigem DCl; ausgezogene Linie: elektrischer Vektor der einfallenden Strahlung ist senkrecht zur Helixachse orientiert; gestrichelte Linie: elektrischer Vektor der einfallenden Strahlung ist parallel zur Helixachse orientiert

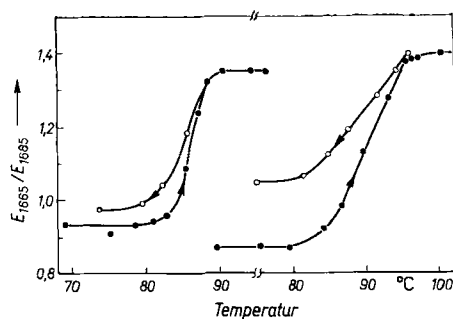


Bild 13
Thermische Denaturierung und „Renaturierung“ (durch langsame Abkühlung) von DNS aus T2-Phagen (linke Seite) und Kalbsthymus (rechte Seite), verfolgt durch Änderung des Verhältnisses der Extinktionen bei 1665cm^{-1} und 1685cm^{-1}

ausbilden. Nähere ultravioletspektroskopische Untersuchungen haben ergeben, daß eine mehr oder minder vollständige Renaturierung in verdünnten wäßrigen Lösungen nur bei DNS hoher Homogenität²⁾ (aus Mikroorganismen, Bakteriophagen oder Pilzen) erfolgt, während heterogene DNS aus höheren Organismen (z.B. aus Kalbsthymus) nicht renaturiert [39]. Es ist aber zweifelhaft, ob diese aus verdünnten Lösungen erzielten Resultate auf die DNS *in vivo* übertragen werden können, während die bei den infrarotspektroskopischen Untersuchungen verwendeten hochkonzentrierten DNS-Lösungen weitaus mehr dem Zustand im lebenden Organismus entsprechen. Deswegen erschien es besonders wichtig, die DNS-Renaturierung infrarotspektroskopisch zu verfolgen. Es zeigte sich, daß homogene DNS (z.B. aus T2-Phagen) beim Abkühlen der hochkonzentrierten wäßrigen Lösungen nicht vollständig renaturiert, der Extinktionsquotient erreicht nicht wieder den Ausgangswert (Bild 13), auch qualitativ entspricht das IR-Spektrum nicht dem Ausgangszustand; heterogene DNS (z.B. aus Kalbsthymus) ergibt überraschenderweise eine „Renaturierung“ von über 65% (gemessen über den Extinktionsquotienten E_{1665}/E_{1685}) (Bild 13). Der hier infrarotspektroskopisch gemessene Grad der Basenpaarung („Renaturierung“) umfaßt sowohl die echte spezifische Basenpaarung (Renaturierung im eigentlichen Sinn) als auch unspezifische Basenpaarungen, wobei zufällig in der Lösung benachbarte komplementäre, in der nativen DNS nicht miteinander verbundene Basenpaare ausgebildet werden [39]. Die infrarotspektroskopischen Messungen zeigen nun, daß im Gelzustand durch die Wechselwirkung zwischen denaturierten DNS-Strängen, die ursprünglich verschiedenen Doppelhelices angehörten, selbst bei homogener DNS beim Abkühlen eine völlige Renaturierung durch Ausbildung aller spezifischen Basenpaarungen nicht mehr möglich ist. Bei der heterogenen DNS wird ebenfalls durch die starke intermolekulare Wechselwirkung und die eingeschränkte Bewegungsmöglichkeit der DNS-Moleküle beim Abkühlen ein hoher Anteil an komplementären Basenpaarungen wieder ausgebildet, wobei zwar die Methodik keine Separation von spezifischen und unspezifischen Basenpaarungen erlaubt, aber eine Abschätzung ergibt, daß auch eine gewisser Anteil ech-

²⁾ Homogene DNS: Die einzelnen DNS-Moleküle sind untereinander gleich, bezüglich Basenzusammensetzung und auch Basensequenz. Heterogene DNS: Die einzelnen DNS-Moleküle haben unterschiedliche Basenzusammensetzung.

ter Renaturierung (spezifischer Basenpaarung) vorhanden sein muß [40]. Es ergeben sich also beim Abkühlen thermisch denaturierter DNS-Lösungen erhebliche Unterschiede zwischen dem Ausmaß an komplementären (spezifischen und unspezifischen) Basenpaarungen in verdünnten wäßrigen Lösungen einerseits (0%) und hochkonzentrierten gelartigen Lösungen andererseits (65%) bei DNS aus höheren Organismen.

5. Wasserstoffisotopenaustausch der DNS

Der Wasserstoffisotopenaustausch ist eine äußerst wertvolle Methode, um Informationen, vor allem über die Tertiärstruktur von Biopolymeren, zu erhalten. Ein Überblick über den Einsatz der Infrarotspektroskopie zur Verfolgung des Wasserstoffisotopenaustausches in Biopolymeren ist kürzlich von *Parker u. Bhaskar* gegeben worden [41]. Von den prinzipiell austauschbaren Protonen (OH-, NH-, SH-Protonen) zeigt nur ein Teil einen praktisch momentanen Austausch, während in vielen Biopolymeren ein unterschiedlicher Anteil der Protonen mehr oder weniger verzögert oder praktisch nicht austauscht. Heute weiß man, daß die momentan austauschenden Protonen zu OH- oder NH-Gruppen gehören, die dem Lösungsmittel frei zugänglich sind. Die verzögert austauschenden Protonen dagegen sind an OH- oder NH-Gruppen gebunden, die im „Inneren“ des Biopolymeren liegen und vom Lösungsmittel mehr oder weniger vollständig abgeschirmt sind. Die Austauschkinetik dieser Protonen ließ sich nur durch die Ausnahme einer „dynamischen Tertiärstruktur“ erklären, derzufolge durch statistische Energiefluktuationen auch solche OH- oder NH-Gruppen kurzzeitig für den Isotopenaustausch freigelegt werden, die nach einem statischen Tertiärstrukturmodell (wie es etwa die Röntgenstrukturanalyse liefert) dem Lösungsmittel prinzipiell nicht zugänglich sein würden.

Der verzögerte Protonenaustausch der DNS wurde von *Printz u. von Hippel* [42] gefunden, wobei pro (A + T)-Basenpaar zwei Protonen und pro (G + C)-Basenpaar drei Protonen verzögert austauschen, was genau den an der komplementären Basenpaarung beteiligten Protonen entspricht. Alle übrigen OH- und NH-Protonen tauschen momentan aus, daneben fanden die Autoren noch Andeutungen einer sehr langsam austauschenden Komponente. *Ostermann u. Mitarb.* [43] fanden, daß ein langsamer Wasserstoffisotopenaustausch der DNS bei Raumtemperatur nicht, bei höheren Temperaturen jedoch erfolgt; bei 55°C beträgt die Halbwertszeit dieses langsamen Protonenaustausches etwa 10 Tage. Die Autoren vermuteten, daß der langsame Austausch auf besonders reaktive C-H-Gruppen der Basen in der DNS zurückzuführen ist. Mittels der NMR-Spektroskopie war die relativ leichte Austauschbarkeit der Protonen am C-8 der Purin-Nucleoside Adenosin und Guanosin gefunden worden [44], doch existierte kein Anhaltspunkt für die Reaktivität dieser Gruppe in der DNS.

Eine Bestätigung der Hypothese von *Ostermann u. Mitarb.* [43] sollte aber infrarotspektroskopisch möglich sein, weil die durch den Protium-Deuterium-Austausch neu entstehenden C—D-Gruppen in einem von anderen Absorptionsbanden der DNS nicht gestörten Bereich des IR-Spektrums nachzuweisen sein

Tabelle 5
IR-Absorptionsmaxima, die (C—H)- oder (C—D)-Valenzschwingungen zugeordnet sind [45]

Substanz	(C—H)-Valenzschwingung in cm^{-1}	(C—D)-Valenzschwingung in cm^{-1}
DNS, unbehandelt	3090, 3120	
DNS, in H_2O inkubiert	3090, 3120	
DNS, in D_2O inkubiert	3090, (3120)	2325
Adenosin	3131	
Adenosin, in D_2O inkubiert		2335
Guanosin	3127	
Guanosin, in D_2O inkubiert		2330
Cytidin	3083	
Cytidin, in D_2O inkubiert		2306
Thymidin	3082	
Thymidin, in D_2O inkubiert		2302
Benzimidazol	3125	
[8-D]-Benzimidazol		2335
Imidazol	3125	
[1, 2, 4, 5-D ₄]-Imidazol		2334

müßten. Experimentell konnte dann auch aus der Lage der neu auftauchenden (C—D)-Valenzschwingungen und der verschwindenden (C—H)-Valenzschwingungen (Bild 14) sowie durch Vergleich mit den IR-Spektren deuterierter Nucleoside und anderer Modellspezies (Tab. 5) die beim langsamen Wasserstoffisotopenaustausch der DNS beteiligten Protonen eindeutig den am C-8 der Adenin- und Guaninreste der DNS gebundenen Protonen zugeordnet werden [45]. Dieser Austausch kann nicht nur an der nativen DNS, sondern auch an der thermisch denaturierten DNS verfolgt werden (Bild 14), bei 95°C ist der Austausch bereits nach 3 Tagen fast vollständig.

Somit ergibt sich (Bild 15) eine Reaktivitätsabstufung für die Wasserstoffatome der DNS nach folgendem Schema [46] (das mittlerweile auch in anderen Überichten Verwendung gefunden hat [47], [48]):

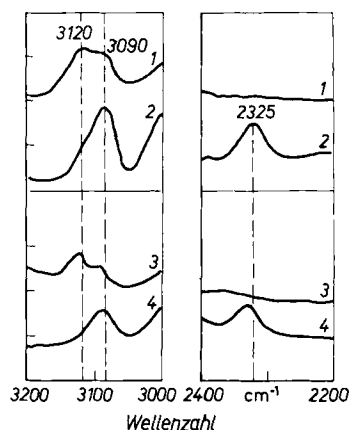


Bild 14
IR-Spektren von Kalbsthymus-DNS nach Inkubation in H_2O und D_2O : 1 3 h bei 95°C in H_2O inkubiert; 2 3 h bei 95°C in D_2O inkubiert; 3 18 Tage bei 55°C in H_2O inkubiert; 4 18 Tage bei 55°C in D_2O inkubiert

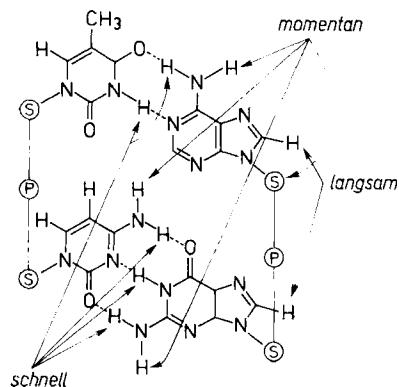


Bild 15
Schematische Darstellung der unterschiedlichen Isotopenaustauschenden der verschiedenen H-Atome in der DNS; S und P symbolisieren die Zucker- bzw. Phosphatreste der DNS

- a) *momentan austauschbare* H-Atome: nicht an der komplementären Basenpaarung beteiligte NH-Protonen, OH-Protonen der 2'-Desoxyribosesterse;
 b) *schnell austauschende* H-Atome: NH-Protonen der komplementären Basenpaarung; der verzögerte Austausch gegenüber den momentan austauschenden Protonen der Gruppe (a) ist mit geeigneten Methoden meßbar [42];
 c) *langsam austauschende* H-Atome: CH-Wasserstoffe am C-8 der Adenin- und Guaninreste (Purinbasen);
 d) *nicht austauschbare* H-Atome: alle übrigen C-H-Wasserstoffe.

Die Kenntnis der Reaktivitätsabstufung der Wasserstoffatome in der DNS ist von großer Bedeutung und kann zur Lösung einer Reihe von Problemen wie der Durchführung selektiver Veränderungen an der DNS oder der Aufklärung von Wirkungsmechanismen biologisch aktiver Substanzen bei der Interaktion mit DNS beitragen.

Der hier untersuchte langsame Wasserstoffisotopenaustausch der DNS hat bereits in vielfältiger Weise Anwendung gefunden. So können deuterium- oder tritiummarkierte Purinnucleoside oder -nucleotide hergestellt werden [49], eine genaue Untersuchung der optimalen Reaktionsbedingungen dieser säure- bzw. basenkatalysierten Austauschprozesse ermöglicht die Synthese aller Nucleoside in deuterierter Form [50]. Besonders wichtig sind aber die Experimente zur *In-vitro*-Markierung von DNS mit Deuterium oder Tritium [51], [52]. Wenn z. B. die biosynthetische Markierung der DNS durch radioaktive Precursoren schwierig oder unmöglich ist, hat sich der langsame Wasserstoffisotopenaustausch als beste von vier untersuchten Methoden zur DNS-Markierung für Hybridisationsexperimente *in vitro* erwiesen [53].

6. Wechselwirkung der DNS mit paramagnetischen divalenten Metallionen

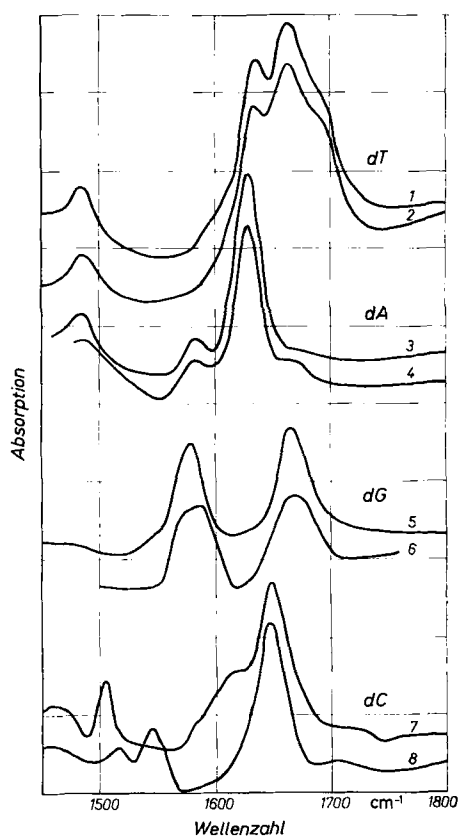
Die große Bedeutung von Metallionen für den Ablauf vieler biologischer Prozesse in der lebenden Zelle ist allgemein bekannt. Besonders gut untersucht wurde der Einfluß zweiwertiger Metallionen auf enzymatisch gesteuerte Reaktionen, doch ist durch zahlreiche Mutationsexperimente auch ein unmittelbarer Einfluß auf das genetische Material experimentell gesichert. Um so mehr interessiert die Frage nach dem Bindungsmechanismus der zweiwertigen Metallionen an die DNS als den Träger der genetischen Information. In den letzten Jahren sind gerade auf diesem Gebiet eine Reihe wichtiger Untersuchungen durchgeführt worden; ein Überblick über die Bindung von divalenten Metallionen an Nucleinsäuren und Wirkungen auf die Polymerstruktur wird von Zimmer [54] gegeben.

Unsere eigenen Untersuchungen beschränken sich hauptsächlich auf die paramagnetischen Ionen Cu^{2+} und Mn^{2+} , weil hier eine günstige Kombination von IR-, NMR- und ESR-Spektroskopie möglich ist.

6.1. Wechselwirkung der DNS und der Nucleoside mit Cu^{2+}

Die Bindung von Cu^{2+} an DNS ist bereits seit langem bekannt und besonders intensiv untersucht worden [54]. Die Bindung erfolgt sowohl an die negativ geladenen Phosphatreste als auch an die Basen der

DNS. Eine Bindung des Cu^{2+} erfolgt auch — allerdings mit wesentlich geringerer Komplexbildungstendenz — an die Nucleoside, bei denen der negativ geladene Phosphatrest fehlt. Die Nucleosid- Cu^{2+} -Bindung läßt sich auch infrarotspektroskopisch nachweisen: In D_2O -Lösung treten an Stelle des Absorptionsmaximums des Desoxyguanosins bei 1580 cm^{-1} nach Zusatz von Cu^{2+} zwei neue Maxima bei 1573 und 1590 cm^{-1} , die bei schlechter Auflösung zu einer breiten Absorptionsbande verschmelzen [55] (Bild 16). Unabhängig von unseren infrarotspektroskopischen Untersuchungen hatten Eichhorn u. Mitarb. [56] aus den NMR-Spektren der Nucleoside und Nucleotide eine Bindung von Cu^{2+} beim Guanotin und auch beim Cytidin nachgewiesen, während beim Adenosin (im Gegensatz zum Nucleotid Adenosin-5'-monophosphat) keine spezifische Bindung festzustellen war. Infrarotspektroskopisch konnten wir ebenfalls eine Komplexbildung zwischen Desoxycytidin und Cu^{2+} nachweisen, wobei (in D_2O -Lösung) die IR-Absorptions-



Bilder 16 u. 17

IR-Spektren der Desoxynucleoside mit und ohne Zusatz von Cu^{2+} in D_2O -Lösung; Kurven 1, 3, 5, 7: IR-Spektren von Desoxythymidin, Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxycytidin; Kurven 2, 4, 6, 8: entsprechende IR-Spektren derselben Desoxynucleotide mit einem Zusatz von 20 Mol CuSO_4 pro Mol Nucleosid

maxima bei 1503 und 1616 cm^{-1} nach dem Zusatz von Cu^{2+} verschwinden und neue Maxima bei 1517 und 1547 cm^{-1} zu beobachten sind (Bild 16); dagegen ändern sich die IR-Spektren der D_2O -Lösungen von Desoxyadenosin und Desoxythymidin bei Cu^{2+} -Zusatz nicht (Bild 17) [57]. Aus den NMR-Spektren konnte eine Bindung des Cu^{2+} am N-7 des Guanosins und am N-3 des Cytidins abgeleitet werden [56].³⁾

³⁾ Die Numerierung erfolgt nach den von der IUPAC als verbindlich erklärten Prinzipien.

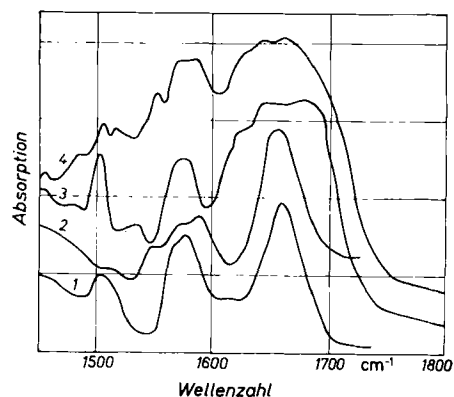


Bild 18
IR-Spektren von: 1 1:1-Mischung von Desoxyguanosin und Desoxycytidin in D_2O -Lösung; 2 dasselbe, jedoch Zusatz von 20fachem molarem Überschuß von $CuSO_4$; 3 DNS-Film (aus *Streptomyces chrysomallus*) in D_2O -Atmosphäre; 4 Film eines DNS- Cu^{2+} -Komplexes in D_2O -Atmosphäre

Unser Hauptinteresse galt der Frage, ob Cu^{2+} in der DNS an denselben Bindungsplätzen fixiert ist wie bei der Wechselwirkung mit den isolierten Nucleosiden (oder Nucleotiden). Diese Frage kann mittels der NMR-Spektroskopie nicht beantwortet werden, weil native doppelsträngige DNS keine beobachtbaren Resonanzsignale liefert (vgl. Abschn. 1.2.). Dagegen sind infrarotspektroskopische Messungen an Filmen des DNS- Cu^{2+} -Komplexes durchführbar, deren Präparation im Abschn. 1.1. beschrieben wurde. Die IR-Spektren der (deutierten) DNS- Cu^{2+} -Komplexe zeigen dieselben charakteristischen Veränderungen gegenüber unbehandelter DNS wie ein äquimolares Gemisch aus Desoxyguanosin und Desoxycytidin bei Cu^{2+} -Zugabe (Bild 18) [58]. Somit erscheint es gerechtfertigt, die mittels der NMR-Spektroskopie erhaltenen Resultate über die Cu^{2+} -Komplexbildung der Nucleoside und Nucleotide auch auf die DNS zu übertragen. Demzufolge bindet Cu^{2+} auch in der DNS am N-7 (und dem Sauerstoff am C-6) der Guaninreste sowie am N-3 der Cytosinreste. Damit wurde erstmals der direkte experimentelle Nachweis der Bindung des Cu^{2+} an die Cytosinreste der DNS erbracht [58].

Diese Resultate führten in Kombination mit anderen Untersuchungen [59], aus denen ein Zusammenhalt der beiden Stränge der DNS-Doppelhelix durch Cu^{2+} abgeleitet wurde, zu einem Modell des Bindungsmechanismus der Cu^{2+} -Ionen an DNS (Bild 19) [54], [59], [60]. Nach unserem Modell erfolgt (in vermutlich sehr schneller Reaktion) als erster Schritt die Ausbildung eines Cu^{2+} -Komplexes mit dem Guaninrest, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen zur komplementären Base Cytosin gelockert werden (Bild 19a). In einer langsameren Reaktion als zweitem Schritt wird der mit dem Cu^{2+} beladene Guaninrest durch Energiefluktuation im Sinne des dynamischen Strukturmodells der DNS [42] kurzzeitig aus der Basenstapelung in das Lösungsmittel herausgeschwenkt und nach einer 180° -Drehung um die C-N-Bindung zwischen Zucker und Base wieder zwischen die benachbarten Basen des betreffenden DNS-Stranges eingelagert.⁴⁾ Diese Drehung ermög-

⁴⁾ Dadurch wird die Nucleosidkonformation von der anti- in die syn-Form umgewandelt, in Analogie zu dem bei der Protonisierung der DNS angenommenen Mechanismus [61].

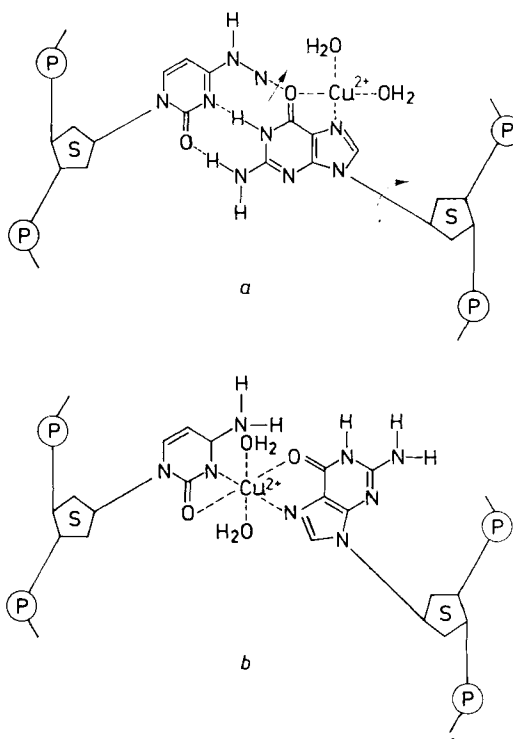


Bild 19
Vorschlag eines Modells zum Bindungsmechanismus des Cu^{2+} an die DNS

licht eine divalente Komplexbindung des Cu^{2+} gleichzeitig an Guanin und Cytosin, womit ein zusätzlicher Energiegewinn verbunden ist (Bild 19b).

Eingehende Untersuchungen wurden zur Klärung folgender Fragen durchgeführt:

- Welche Nucleoside bilden in wäßriger Lösung und/oder im festen Zustand Komplexe mit Cu^{2+} ?
- Ist die Bindung des Cu^{2+} an das Guanin (sowohl im festen Zustand als auch in wäßriger Lösung) mit einer Enolisierung der Carbonylgruppe verbunden?

Die Komplexbildung zwischen Cu^{2+} und Nucleosiden in wäßriger Lösung verfolgten wir auch mit der ESR-Spektroskopie [62], [63]. Es ergab sich abnehmende Stärke der Wechselwirkung in der Reihe Inosin, Desoxyguanosin, Desoxycytidin, Desoxyadenosin, Desoxyuridin (Tab. 6).

Tabelle 6
Aus den Elektronenspinresonanz-Signalen ermittelte g -Faktoren für Cu^{2+} -Nucleosid-Komplexe in wäßriger Lösung [63]

Komplex	g -Faktor
Cu^{2+} , Inosin	2,12 ₂
Cu^{2+} , Desoxyguanosin	2,11 ₃
Cu^{2+} , Desoxycytidin	2,10 ₃
Cu^{2+} , Desoxyadenosin	— (Ausfällung)
Cu^{2+} , Desoxyuridin	keine Komplexbildung beobachtbar

Die für die Cu^{2+} -Nucleosid-Komplexe im festen Zustand von verschiedenen Autoren infrarotspektroskopisch beobachtete Enolisierung [64], [65] wurde auch auf die Cu^{2+} -Komplexe des Guanosins und Inosins in wäßriger Lösung übertragen. Das steht im Widerspruch zu den Infrarotspektren der Nucleoside in D_2O -Lösung; weder bei Desoxyguanosin (Bild 20) noch bei Inosin (Bild 21) bewirkt Cu^{2+} -Zusatz eine Abnahme der C=O-Valenzschwingung und die korrespondierende Zunahme einer Enolbande bei Wellen-

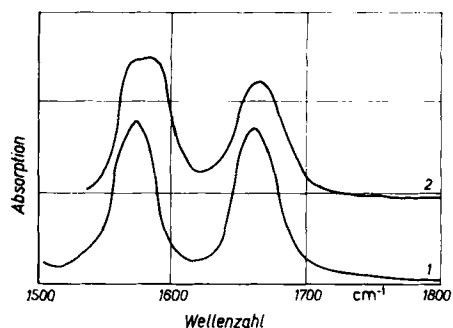


Bild 20
IR-Spektren des Desoxyguanosins (7,5 mM in D_2O); 1 ohne Cu^{2+} -Zusatz; 2 20facher Überschuß von $CuSO_4$

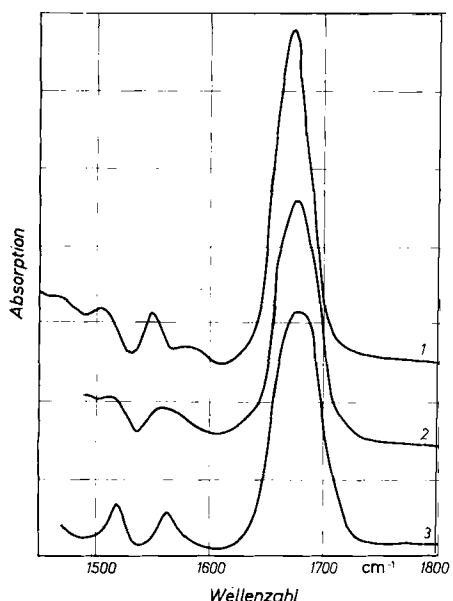


Bild 21
IR-Spektrum des Inosins (15 mM in D_2O); 1: ohne Cu^{2+} -Zusatz; 2: 5facher Überschuß von $CuSO_4$; 3: 20facher Überschuß von $CuSO_4$

zahlen unterhalb von 1630 cm^{-1} (nach Miles [66], [67] sind die Enolbanden etwa bei 1615 cm^{-1} zu erwarten), lediglich eine geringe Verbreiterung der $C=O$ -Valenzschwingungsbande tritt ein. Auch in Dimethylsulfoxid liegt der Cu^{2+} -Guanosin-Komplex in der Ketoform vor, denn die Absorptionsbande bei 1690 cm^{-1} ist auch nach Cu^{2+} -Zusatz noch zu beobachten [64]. Somit sprechen einige Fakten gegen eine Enolisierung des Guanosins und Inosins bei der Ausbildung der Cu^{2+} -Komplexe in wäßriger Lösung.

Wegen der engen Verwandtschaft des Inosins zum Guanosin interessierten die Bindungsstellen des Cu^{2+} am Inosin. Zur Klärung dieser Frage wurde — analog zu den Untersuchungen von Eichhorn u. Mitarb. [56] — die Tatsache ausgenutzt, daß die Protonenrelaxationszeiten durch benachbarte paramagnetische Ionen stark verkürzt werden. Die der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 umgekehrt proportionale Halbwertsbreite $\Delta\nu_{1/2}$ des Resonanzsignals vergrößert sich dabei [68].

Das NMR-Spektrum des Inosins (60 MHz; gelöst in Dimethylsulfoxid- $[D_6]$) zeigt Protonenresonanzen bei 8,27 und 8,01 ppm, die den Protonen H-8 und H-2 zuzuordnen sind. Das Dublett bei 5,85 und 5,76 ppm ist dem Proton H-1' des Riboserestes zuzuordnen (Bild 22). Eine merkliche Verbreiterung des Resonanz-

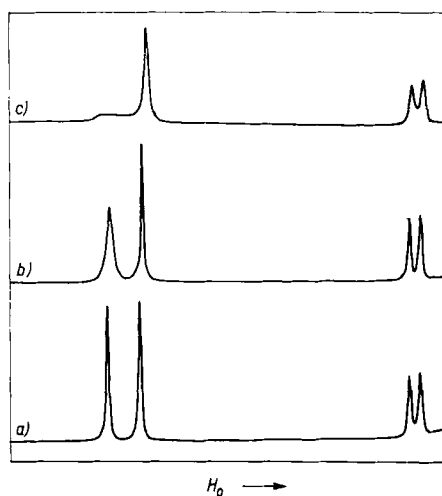
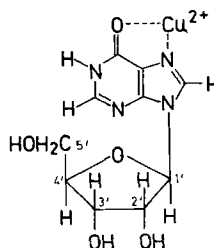


Bild 22
Protonenresonanzspektren (60 MHz) von Inosin (0,25 m in Dimethylsulfoxid- D_6): a) ohne Zusatz; b) Zusatz von $2 \cdot 10^{-5}\text{ m}$ Cu^{2+} ; c) Zusatz von $3,75 \cdot 10^{-4}\text{ m}$ Cu^{2+} ; Resonanzsignalzuordnung (von links nach rechts): Protonen am C-8, C-2, C-1' (Dublett)

signals des H-8 erfolgt bereits bei einer Cu^{2+} -Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}\text{ m}$, bei $3,75 \cdot 10^{-4}\text{ m}$ Cu^{2+} ist diese Resonanzlinie infolge der starken Verbreiterung schon fast nicht mehr zu beobachten, während die Resonanzsignale des H-2 und des H-1' noch scharf sind. Somit erfolgt die Komplexbindung des Cu^{2+} (analog zum Guanosin) in der Nachbarschaft zum H-8, also am N-7. In Kombination mit den IR-Spektren des Inosins und des Cu^{2+} -Inosin-Komplexes in D_2O -Lösung (Bild 21) ergibt sich folgende Struktur für den Cu^{2+} -Inosin-Komplex in wäßriger Lösung [69]:



Diese Gleichheit der Bindungsstellen des Cu^{2+} bei Guanosin und Inosin hat nun eine interessante Konsequenz. Wenn das von uns vorgeschlagene Modell der Cu^{2+} -DNS-Wechselwirkung (Bild 19) zutreffend ist, sollten auch im Poly (I · C), dem doppelsträngigen synthetischen Polynucleotid aus den zwei Einzelsträngen Polyinosylsäure (Poly I) und Polycytidylsäure (Poly C), die beiden Stränge durch simultan am Inosin und Cytidin angreifenden Cu^{2+} -Ionen zusammengehalten werden. Tatsächlich fanden Eichhorn u. Tarien experimentell die dann zu erwartende Reversibilität der durch Cu^{2+} ausgelösten Denaturierung des Poly (I · C) bei Elektrolytzusatz [70].

6.2. Wechselwirkung der DNS und der Nucleoside mit Mn^{2+}

In zahlreichen Untersuchungen konnte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie eine Wechselwirkung zwischen Adenosintriphosphat und Mn^{2+} nachgewiesen werden [71]–[76]; das Mn^{2+} ist dabei simultan an die Phosphatgruppe und an den Purinring gebunden. Eine ge-

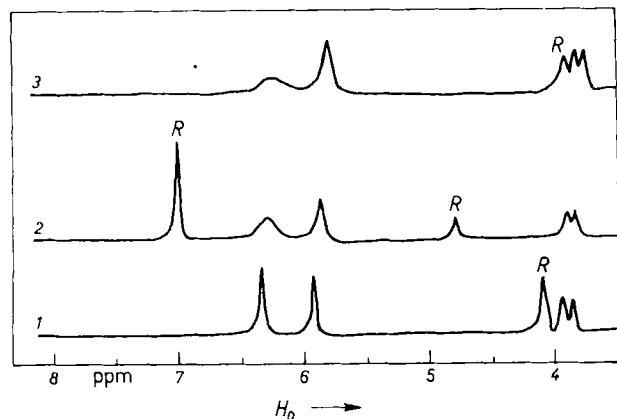


Bild 23
Protonenresonanzspektren (60 MHz) von Adenosindiphosphat (0,2 M in D_2O): 1 ohne Zusatz; 2 Zusatz von $1,25 \cdot 10^{-5}$ m Mn^{2+} ; 3 Zusatz von $2,5 \cdot 10^{-5}$ m Mn^{2+} ; (R = Rotationsseitenbänder der HDO-Resonanz); Resonanzsignalzuordnung (von links nach rechts): Protonen am C-8, C-2, C-1' (Dublett)

naue Analyse ergab als Bindungsstellen des Adeninrestes N-7 und die NH_2 -Gruppe am C-6 [73].

Unsere eigenen Untersuchungen knüpfen hier an. Durch die Messung der relativen Linienverbreiterung bei Zusatz von Mn^{2+} zu der Lösung des untersuchten Nucleosids (gelöst in Dimethylsulfoxid- $[D_6]$) oder Nucleotids (gelöst in D_2O) konnten bisher folgende Resultate erzielt werden [74]:

a) Ähnlich wie Adenosintriphosphat binden auch Adenosindiphosphat (Bild 23) und Adenosinmonophosphat Mn^{2+} spezifisch am N-7 des Purinringes.

b) Adenosin (entsprechend auch Desoxyadenosin) dagegen bindet zwar auch noch schwach Mn^{2+} , aber die Wechselwirkung ist nicht mehr streng am N-7 lokalisiert; eine weitere Bindungsstelle befindet sich in Nachbarschaft zum H-2, dessen Protonenresonanzsignal bei Mn^{2+} -Zusatz ebenfalls verbreitert wird (Bild 24).

c) Hinsichtlich Bindungsstärke und Lokalisierung der Wechselwirkung mit Mn^{2+} ähneln Guanosin und Guanosinmonophosphat den entsprechenden Adeninderivaten, unterscheiden sich von diesen aber durch ihre wesentlich geringe Wechselwirkungstendenz.

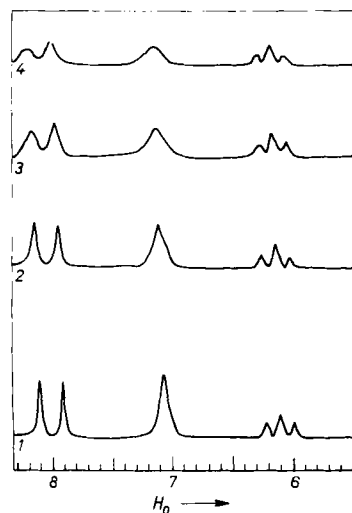


Bild 24
Protonenresonanzspektren (60 MHz) von Desoxyadenosin (0,2 m in Dimethylsulfoxid- $[D_6]$): 1 ohne Zusatz; 2 Zusatz von $5 \cdot 10^{-6}$ m Mn^{2+} ; 3 10^{-5} m Mn^{2+} ; 4 $1,5 \cdot 10^{-5}$ m Mn^{2+} ; Resonanzsignalzuordnung (von links nach rechts): Protonen am C-8, C-2, NH_2 , C-1' (Triplet)

Tabelle 7

Relative Linienverbreiterungen einiger Protonenresonanzsignale von Nucleosiden und Nucleotiden bei Zusatz von Mn^{2+} -Ionen (bezogen auf die Linienbreite der H-1'-Resonanzsignale)

Substanz (Lösungsmittel)	Konzentration des Mn^{2+} in Mol/l	Relative Linienverbreiterungen der Protonenresonanzen		
		H-8	H-2	NH_2
Desoxyadenosin [$DMSO^*$]	$1,5 \cdot 10^{-4}$	4,2	3,3	2,1
Adenosindiphosphat (D_2O)	$1,2 \cdot 10^{-4}$	2,8	1,2	—
Guanosin ($DMSO$)	$0,7 \cdot 10^{-4}$	1,6	—	1,0
	$1,5 \cdot 10^{-4}$	2,0	—	1,0
Guanosinmonophosphat (D_2O)	$0,75 \cdot 10^{-4}$	3,0	—	—

* $DMSO$ = Dimethylsulfoxid- $[D_6]$

d) Das NMR-Spektrum des dem Guanosin eng verwandten Inosins zeigt bei Mn^{2+} -Zusatz keine spezifische Linienverbreiterung [69].

e) Eine spezifische Linienverbreiterung in den NMR-Spektren der Pyrimidinnucleoside und -nucleotide bei Mn^{2+} -Zusatz ist nicht beobachtbar.

Insgesamt ergibt sich aus diesen in Tab. 7 zusammengefaßten Messungen folgendes Bild: Im Gegensatz zum Cu^{2+} , das mit Inosin, Guanosin und Cytidin auch in Abwesenheit von Phosphatgruppen starke und bindungsortspezifische Wechselwirkung zeigt, findet mit Mn^{2+} nur dann eine spezifische Wechselwirkung statt, wenn gleichzeitig das Metallion an einem Phosphatrest gebunden ist (also bei den Nucleotiden). Die Stärke dieser spezifischen Mn^{2+} -Komplexbindung der Nucleotide nimmt bei den Purinderivaten in der Reihenfolge Adenin, Guanin, Inosin ab, während die Pyrimidinderivate mit dieser Untersuchungsmethode keinerlei Wechselwirkungstendenz mit Mn^{2+} erkennen lassen. Bei den Nucleosiden bilden die Purinderivate Adenosin und Guanosin Mn^{2+} -Komplexe, die aber wesentlich schwächer als bei den dazugehörigen Nucleotiden sind und keine spezifische Bindung an einer bestimmten Stelle des Puringerüsts mehr zeigen.

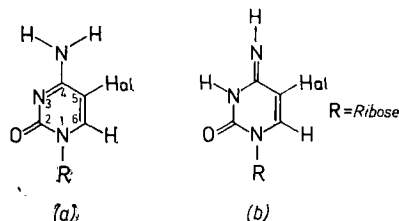
Analog der beim Cu^{2+} -DNS-Komplex entwickelten Untersuchungsmethode ist auch hier eine Kombination der NMR- mit der IR-Spektroskopie und damit die Messung der Mn^{2+} -Wechselwirkung direkt mit der DNS möglich. Aus diesen noch nicht abgeschlossenen Messungen geht hervor, daß durch den bifunktionellen Angriff des Mn^{2+} -Ions sowohl an den Phosphatgruppen als auch an den Purinbasen der DNS eine Störung der DNS-Sekundärstruktur hervorgerufen wird. Während die quantitative Auswertung der Bandenintensitäten beim aus Vergleichszwecken mit untersuchten Mg^{2+} -DNS-Komplex keine signifikanten Abweichungen von den Werten der reinen DNS ergibt, bewirkt Mn^{2+} -Zusatz eine Abnahme der Intensität bei 1505 cm^{-1} und bei 1676 cm^{-1} , dagegen eine Zunahme bei 1530 cm^{-1} . Aus diesen vorläufigen Resultaten kann auf eine Annäherung der DNS-Sekundärstruktur des Mn^{2+} -DNS-Komplexes an den denaturierten Zustand geschlossen werden.

Alle diese Ergebnisse gliedern sich gut in die in jüngster Zeit erzielten Resultate anderer Untersuchungsmethoden [54] ein.

7. Behinderte Rotation bei 5-Halogendesoxycytidinen

Halogensubstitution der Pyrimidinbasen der DNS bzw. RNS führt zu Derivaten, die von beträchtlichem molekularbiologischem (5-Bromdesoxyuridin) und

medizinischem Interesse (antivirale Wirkung des 5-Joddesoxyuridins) sind. Bei der Untersuchung der Halogenierungsreaktionen des Desoxycytidins [78] wurde ein Monojodderivat erhalten, das nach dem Protonenresonanzspektrum eindeutig als 5-Joddesoxycytidin identifiziert wurde. Im Erwartungsbereich des NH_2 -Resonanzsignals sind zwei Signale zu beobachten, so daß eine durch die Halogenierung verursachte tautomere Umlagerung der Aminoform (a) in die Iminoform (b) auch in Betracht gezogen werden



mußte. Durch Einbeziehen des 5-Chlor- und des 5-Bromdesoxycytidins versuchten wir, aus den IR-Spektren die in wäßriger Lösung vorliegende tautomere Struktur zu bestimmen. In der Iminoform (b) ist die Carbonylgruppe (im Gegensatz zur Aminoform) nicht in die Konjugation einbezogen, so daß die Valenzschwingung der Carbonylgruppe bei merklich höheren Wellenzahlen absorbieren sollte als die entsprechende Schwingung der Aminoform (a). An Modellsubstanzen mit festgelegter tautomerer Struktur (als Iminomodell diente dabei das 1,3-Dimethylcytosin) konnte Miles zeigen, daß die $\text{C}=\text{O}$ -Valenzschwingung für die Aminoform (a) unterhalb von 1650 cm^{-1} liegen soll, während sie für die Aminoform (b) bei 1670 cm^{-1} zu finden ist; zusätzlich hat die Iminoform noch ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 1580 cm^{-1} [66]. Die IR-Spektren der 5-Halogendesoxycytidine haben in D_2O -Lösung in dem untersuchten Bereich von $1500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ keine Absorptionsmaxima oberhalb von 1650 cm^{-1} und auch bei 1580 cm^{-1} keine Absorptionsmaxima, sondern Minima (Tab. 8); der Absorptionstyp spricht demnach eindeutig für die Aminoform (a), eine durch die Halogenierung verursachte tautomere Verschiebung zugunsten der Iminostruktur (b) des Desoxycytidins kann also ausgeschlossen werden [79].

Somit muß für die beobachteten zwei Protonenresonanzsignale der NH_2 -Gruppe eine andere Erklärung gefunden werden. Es wäre denkbar, daß die Halogensubstituenten in 5-Position in Wechselwirkung mit einem der Protonen der Aminogruppe treten. Diese Wechselwirkung würde eine Rotationsbehinderung der Aminogruppe um die ($\text{C}_4\text{--N}$)-Achse nach sich ziehen und eine Aufspaltung des Protonenresonanzsignals in ein Dublett bewirken. Der Nachweis einer derartigen Rotationsbehinderung ist durch temperaturabhängige Messungen des NMR-Spektrums mög-

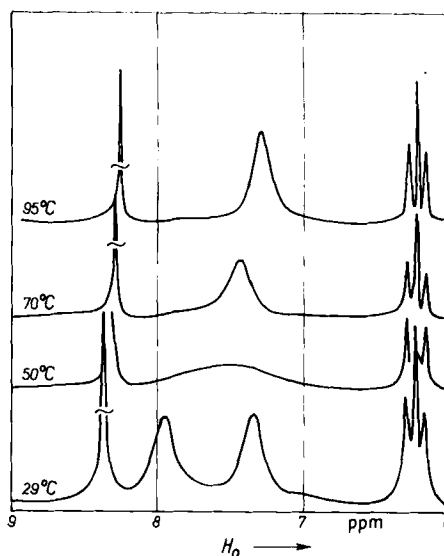


Bild 25
Protonenresonanzspektrum (100 MHz) von 5-Chlor-desoxycytidin (0,2 m in Dimethylsulfoxid- D_6) bei 29°C , 50°C , 70°C und 95°C ; Resonanzsignalzuordnung (von links nach rechts): C-8, NH_2 (Dublett), C-1' (Triplett)

lich, denn mit steigender Temperatur nimmt die Rotationsbehinderung laufend ab, die Dublettkomponenten nähern sich an und verschmelzen schließlich zu einem einzigen Resonanzsignal [80].

Die experimentelle Prüfung bestätigte die Annahme einer Rotationsbehinderung. So verschmilzt das bei 29°C noch vorhandene Dublett zwischen 7 und 8 ppm im NMR-Spektrum des 5-Chlor-desoxycytidins bereits bei 50°C zu einem einzigen breiten Signal, das sich mit steigender Temperatur verschärft (Bild 25); weiterhin läßt sich aus den Protonenresonanzspektren eine Zunahme der Rotationsbehinderung vom Chlor- zum Joddesoxycytidin ableiten.

Aus den gemessenen IR- und NMR-Spektren ergibt sich demzufolge, daß die 5-Halogenderivate des Desoxycytidins in der Aminoform (a) vorliegen, wobei aber im Gegensatz zum Desoxycytidin durch die Wechselwirkung der Aminogruppe mit dem elektro-negativen Substituenten die Rotation der Aminogruppe um die C--N -Bindung behindert ist [79]. Da die Aminogruppe an der komplementären Basen-paarung des Cytosins zum Guanin in der DNS beteiligt ist, kann diese Wechselwirkung durchaus die molekularbiologische Interpretation für den biologischen Wirkungsmechanismus dieser und ähnlicher Verbindungen (auch 5-Fluorcytosin ist biologisch aktiv [81]) erleichtern.

8. Zur Frage des Protonentunnels in der DNS

Von Löwdin [82] wurde die Hypothese aufgestellt, daß Protonentransfer in der Nucleinsäure über das Wasserstoffbrückensystem der komplementären Basen Guanin-Cytosin (G-C) und Adenin-Thymin (A-T) hinweg eine Verfälschung der genetischen Information verursachen kann; damit wäre der quantenmechanische Tunneleffekt als mögliche Ursache von Spontanmutationen und damit auch von spontaner Cancerogenese und von Alterungsprozessen anzusehen. Nun reicht zur Auslösung einer Spontanmutation bereits ein einziger Protonensprung aus,

Tabelle 8
IR-Absorptionsmaxima der 5-Halogendesoxycytidine und Vergleichs-substanzen

Verbindung	Lage der IR-Absorptionsmaxima (in cm^{-1})		
Desoxycytidin	1503	1616	1652
5-Chlor-desoxycytidin	1530	1620	1648
5-Brom-desoxycytidin	1522	1614	1642
5-Jod-desoxycytidin	1518	1610	1631
1,3-Dimethylcytosin [79]	1579	1657	1671

der mit physikalischen Methoden kaum nachweisbar sein dürfte. Andererseits zitiert aber Löwdin [82] die von Zimmermann [83] am Imidazol durchgeführten infrarotspektroskopischen Untersuchungen als Beweis für das Protonentunneln über derartige intermolekulare Wasserstoffbrücken hinweg.

Wegen der großen Bedeutung dieses Problems haben wir Modelle der komplementären Basen (1:1-Mischkristalle der entsprechenden Basen, die an Stelle der Desoxyribose eine Methyl- oder Äthylgruppe tragen) infrarotspektroskopisch untersucht. Wenn die dem breiten Massiv der NH-Valenzschwingungsbande überlagerten Submaxima durch Kombination von Frequenzmodulation und Protonentunneln [83] verursacht würden, müßten beim Abkühlen auf -150°C nach theoretischen Überlegungen [84]–[87] drastische Frequenz- und Intensitätsänderungen der Submaxima zu beobachten sein. Experimentell konnten aber diese erwarteten Effekte nicht beobachtet werden [88], so daß offensichtlich in Analogie zum Purin [87] und Benzimidazol [89], [90] die Submaxima durch Fermi-Resonanz [91] mit Kombinations- und Oberschwingungen erklärt werden müssen. Protonentunneln kann in diesen Basenpaarmodellen in meßbarem Umfang ausgeschlossen werden.

Beide hier verwendeten Basenpaarmodelle sind durch die Röntgenstrukturanalyse in ihrer Struktur gut bekannt. Die Differenzen zwischen den IR-Spektren der 1:1-Mischkristalle und denen der mechanischen Mischungen der Komponenten im 1:1-Molverhältnis sind auf die Ausbildung starker Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Purin- und Pyrimidinbasen im Mischkristall einerseits und die wesentlich schwächeren Wasserstoffbrücken der Purin-Purin- bzw. Pyrimidin-Pyrimidin-Wechselwirkung in den mechanischen Mischungen andererseits zurückzuführen. Damit ist eine Zuordnung derjenigen Schwingungen möglich, die an der Purin-Pyrimidin-Wechselwirkung im A–T- [92] bzw. G–C-Modell [93] beteiligt sind.

9. Weitere Untersuchungen (Literaturübersicht)

Photochemische Reaktionsprodukte und Reaktionsmechanismen der DNS-Bausteine wurden mit der IR- [94]–[96] und NMR-Spektroskopie [95], [97], [98] untersucht.

Die Konformation des Pseudouridins (Ribose ist hier über das C-5 an den Pyrimidinring gebunden) konnte aus den NMR-Spektren bestimmt werden [99]–[101]: die spezielle Struktursignifikanz des Pseudouridins in der t-RNS beruht nicht auf einer besonderen Konformation, sondern vermutlich auf der Fähigkeit, am N-1 als Protonenakzeptor eine H-Brücke ausbilden zu können [100].

Zur Konformationsanalyse der Nucleoside und Nucleotide wurde bei kernresonanzspektroskopischen Messungen auch der Kern-Overhauser-Effekt herangezogen, der räumliche Nachbarschaft von (nicht spingekoppelten) Kernen indiziert [102], [103].

Die NMR-Spektroskopie kann aus konzentrationsabhängigen Änderungen genaueste Aufschlüsse über die räumliche Anordnung der in wäßriger Lösung übereinander gestapelten Basen geben (Übersicht: [104]). Mit dieser Methodik wurden 7-Methylinosin [105] und Coffein [106] und eine Reihe von Dinucle-

otiden wie ApA, ApC und CpA [107], [108] untersucht. Auch die Einlagerung von Purin zwischen die Adeninringe im ApA [107] und die Uracilringe in Polyuridylsäure [109] wurde so studiert. Auf Einlagerung (Intercalation) zwischen die DNS-Basen wird bekanntlich auch die biologische Aktivität der Acridinfarbstoffe und des Actinomycins zurückgeführt; entsprechende NMR-Studien über die Acridin-DNS [110] und die Actinomycin-Oligonucleotid-Wechselwirkung [111], [112] bestätigen die Einlagerungshypothesen.

An Modellsubstanzen für die komplementäre Basenpaarung kann die Wasserstoffbrückenbildung in nichtwäßrigen Lösungsmitteln mit Hilfe der IR- [1] und NMR-Spektroskopie [3] untersucht werden. Mit der letzteren Methode wurde die G–C-Basenpaarung in Dimethylsulfoxid [113] und die A–T- bzw. A–U-Basenpaarung in Chloroform untersucht [114]. Das bei der Reaktion mit dem mutagenen Agens Hydroxylamin entstehende N(4)-Hydroxycytosin ist nach infrarotspektroskopischen Messungen nicht mehr spezifisch an das Guanosin, sondern an das Adenosin über H-Brücken gebunden [115]; die mutagene Wirkung des Hydroxylamins kann demzufolge auf diese Fehlcodierung beim Ablesen der genetischen Information zurückgeführt werden.

Kombinierter Einsatz von Circular dichroismus und Infrarot-Linear dichroismus lieferte Informationen über die Beeinflussung von Konformation und Konformationsstabilität des Riboserestes durch die An- oder Abwesenheit der 2'-OH-Gruppe (Ribose in RNS, 2'-Desoxyribose in DNS); in der DNS beträgt nach infrarotdichroitischen Messungen der Winkel zwischen der (O...P...O)-Winkelhalbierenden zur Helixachse 70° , in der RNS 39° [116].

In der ribosomalen RNS sind über 60% der Basen gepaart, wie sich aus den IR-Spektren in wäßriger Lösung ergab [117], [118]; dieser Wert gilt sowohl für die isolierte als auch für die an das Ribosom gebundene RNS [119].

Protonenresonanzspektroskopische Untersuchungen befaßten sich mit der thermischen Denaturierung einsträngiger Polyadenylsäure [120] und mit t-RNS [121], [122]. In der letzten Arbeit wird die Lösungsmitteldenaturierung durch Zusatz von Dimethylsulfoxid verfolgt; dieses Lösungsmittel hebt die hydrophobe Basenwechselwirkung (Stapelung) auf, die Basen werden mit zunehmendem Anteil des organischen Lösungsmittels beweglicher und die dazugehörigen Protonenresonanzsignale zunehmend schärfer. Da zuerst die nicht gepaarten Basen der Schlaufen beweglich werden, können so die hier eingebauten seltenen Basen identifiziert werden. Wichtige Aufschlüsse über die Hydratation der DNS können die IR-Spektren von (orientierten) DNS-Filmen ergeben [1]. Aus Tumoren isolierte DNS ergab dabei Abweichungen vom Hydratationsverhalten gegenüber normaler DNS. Der Tumor-DNS fehlt offenbar das für DNS charakteristische Vermögen, reversible Konformationsänderungen beim Dehydratisieren bzw. Rehydratisieren durchführen zu können [123]. Es wird vermutet, daß diese Konformationsübergänge zur Regelung metabolischer Prozesse lebenswichtig sind. Die Wassermoleküle in der Hydratationssphäre der DNS haben nach neueren infrarotspektroskopischen

Untersuchungen [124] keine oft vermutete quaskristalline oder „eisähnliche“ Struktur.

Die molekularbiologisch besonders wichtige Nucleinsäure-Protein-Wechselwirkung ist wiederholt mit der NMR-Spektroskopie untersucht worden. So konnten aus der Signalverbreiterung der Protonenresonanzen von Inhibitoren wie 5'-Cytidinmonophosphat bei der Bindung an Ribonuclease-A Modelle für die Enzym-Inhibitor-Komplexe abgeleitet werden [125]. Umgekehrt ließ sich aus der Signalverbreiterung der α -CH₂-Protonenresonanzen von Oligopeptiden beim Zusatz von löslicher RNS auf den Bindungsmechanismus der Nucleinsäure-Protein-Wechselwirkung schließen [126].

10. Ausblick

Auf dem Gebiet der Infrarotspektroskopie ist in den nächsten Jahren mit wesentlichen gerätetechnischen Fortschritten (abgesehen für spezielle Einsatzzwecke, z.B. Kurzzeitspektroskopie) nicht zu rechnen. Das ferne Infrarot, inzwischen mit kommerziellen Spektralphotometern und Interferometern erschlossen, ist allerdings für die Nucleinsäureforschung noch nicht herangezogen worden, obwohl gerade durch diesen Spektralbereich sicher noch wertvolle Informationen gewonnen werden können.

Durch die Einführung des Lasers als Strahlungsquelle hat bekanntlich die Raman-Spektroskopie eine Renaissance erfahren und wird auch in der Nucleinsäureforschung in zunehmendem Maße eingesetzt. Auch hier sind die Anwendungsmöglichkeiten längst noch nicht ausgeschöpft worden.

Die konventionelle Protonenresonanzspektroskopie konnte in ihrer Aussagekraft durch den Einsatz der recht kostspieligen 220 MHz-Geräte (jetzt bereits auf 300 MHz erweitert) erheblich vertieft werden, doch ist nun in dieser Richtung keine wesentliche Steigerung zu erwarten. Der Einsatz von Spektrenakkumulatoren zur Empfindlichkeitssteigerung ist fast schon selbstverständlich, eine große Hilfe bedeuten auch die Doppel- und Tripelresonanzverfahren, wobei vor allem die Ausnutzung des Kern-Overhauser-Effekts Fortschritte in der Konformationsanalyse ermöglicht.

Eine echte revolutionäre Entwicklung ist aber in den nächsten Jahren für die ¹³C-Kernresonanzspektroskopie zu erwarten, vor allem durch die Einführung der Puls- und Fouriertransformierungs-Spektroskopie [127]. Die großen Vorzüge der ¹³C- gegenüber der ¹H-NMR-Spektroskopie beruhen auf den bedeutenden größeren chemischen Verschiebungen der Signale und auf der Möglichkeit, auch noch größere Makromoleküle untersuchen zu können [128]. Schon jetzt zeichnet sich ab, daß die ¹³C-NMR-Spektroskopie eine der wichtigsten und informativsten Untersuchungsmethoden für molekularbiologische Wechselwirkungsprozesse sein wird. Vollständige Zuordnungen der Resonanzsignale sind für die ¹³C-NMR-Spektren der Nucleoside bereits getroffen worden [129]–[132], so daß Interaktionsstudien auf der Ebene der Nucleoside bereits begonnen werden könnten.

Die NMR-Spektroskopie weiterer Kerne, wie ³¹P [133] und ²³Na [134], ist auch schon in der DNS-Forschung genutzt worden, jedoch ist diese Variante in ihrer Aussagekraft sicher noch nicht ausgeschöpft.

Ähnliches gilt für die Protonenrelaxationsmessungen, obwohl hier bereits Ergebnisse über die DNS-Hydratation [135] und die Mn²⁺-DNS-Wechselwirkung [126]–[138] vorliegen.

Eine effektive Forschungsarbeit kann aber selbstverständlich nur durch Integration möglichst vieler Untersuchungsmethoden erzielt werden. Viele wichtige Ergebnisse wurden in der Nucleinsäureforschung durch Kombination mit anderen Methoden, wie UV-Vis-Spektroskopie, Fluoreszenz, Elektronenspinresonanz (einschließlich der Spinmarkierungstechnik [139], [140]), elektrochemischen Meßverfahren, hydrodynamischen Untersuchungsmethoden, vor allem aber ORD/CD (optische Rotationsdispersion/Circular dichroismus), erzielt; als Beispiel dafür möge die Untersuchung über die DNS-Cu²⁺-Wechselwirkung dienen [59].

In Zukunft wird durch das Zusammenspiel der genannten spektroskopischen Meßmethoden eine genaue Kenntnis über den Wirkungsmechanismus der am genetischen Material direkt angreifenden biologisch aktiven Agenzien und über die Protein-DNS-Wechselwirkung ermöglicht werden. Somit werden auch die hier behandelten Methoden der IR- und NMR-Spektroskopie ihren Beitrag zur Lösung wichtiger molekularbiologischer Probleme beisteuern.

11. Zusammenfassung

Es wird ein Überblick über eigene Untersuchungsergebnisse gegeben, die durch den Einsatz von IR- und NMR-Spektroskopie in der Nucleinsäureforschung erzielt wurden. Ausgangspunkt war die Analyse der IR-Spektren von DNS aus verschiedenen Mikroorganismen, wodurch die Zuordnung einer Reihe von Infrarotabsorptionsmaxima zu bestimmten Basen der DNS möglich wurde. Daraus ließ sich eine verlustfreie Schnellmethode zur quantitativen Bestimmung der DNS-Basenzusammensetzung entwickeln, die sich auch im praktischen Einsatz bewährt hat. Weiterhin ermöglichen diese Untersuchungen eine basenspezifische Lokalisation von Wechselwirkungen mit DNS. Die langsam austauschenden Protonen der DNS konnten infrarotspektroskopisch eindeutig als am C-8 der Purinbasen gebunden identifiziert werden. Es wurde ein Wasserstoffisotopenaustauschschema der DNS aufgestellt, wonach die H-Atome in vier Klassen eingeteilt werden können.

Die Infrarotspektroskopie kann die thermische Denaturierung der DNS im hochkonzentrierten, gelartigen Zustand (mit weitgehender Angleichung an den Zustand der DNS *in vivo*) quantitativ verfolgen. Der „Schmelzpunkt“ der DNS ist auch unter diesen Bedingungen linear mit dem Anteil an (G + C)-Basenpaaren der DNS korreliert. Die thermische Denaturierung scheint hierbei für DNS aus höheren Organismen in größerem Maß reversibel zu sein als in verdünnten Lösungen. Die Säuredenaturierung der DNS führt auch bei der Fixierung an eine Unterlage zu einer völligen Aufhebung der Basenstapelung.

Durch Kombination von NMR- und IR-Spektroskopie können die Bindungsstellen paramagnetischer divalenter Metallionen in der DNS ermittelt werden. Diese Ergebnisse führten zusammen mit den Resultaten

taten anderer Meßmethoden zur Aufstellung eines Modells für den Wechselwirkungsmechanismus zwischen DNS und Cu^{2+} . Eine stärkere und ortsspezifische Bindung des Mn^{2+} an die Purinbasen erfolgt nach den NMR-Spektren bei den Nucleotiden, aber nicht bei den Nucleosiden; offensichtlich begünstigt eine Fixierung des Mn^{2+} an den Phosphatrest die Wechselwirkung mit dem Purinringsystem.

Aus der Temperaturabhängigkeit des NMR-Spektrums konnte eine Rotationsbehinderung der Amino-Gruppe in 5-Halogendesoxycytidinen abgeleitet werden.

Tiefemperatur-IR-Spektren von Basenpaarmodellen der DNS konnten einen Protonentransfer über das Wasserstoffbrückensystem der komplementären Basen hinweg ausschließen.

Abschließend wird eine kurze Übersicht über wesentliche Fortschritte in der Nucleinsäureforschung durch Anwendung der IR- oder NMR-Spektroskopie und ein Ausblick auf die sich durch die technische Weiterentwicklung abzeichnenden weiteren Einsatzmöglichkeiten dieser beiden Untersuchungsmethoden gegeben.

Literatur

- [1] Tsuboi, M.: Appl. Spectroscopy Reviews **3**, 45 (1969)
- [2] Ts'o, P. O. P., Schweizer, M. P., u. D. P. Hollis: Ann. New York Acad. Sci. **158**, 256 (1969)
- [3] Rowe, J. J. M., Hinton, J., u. K. L. Rowe: Chem. Reviews **70**, 1 (1970)
- [3a] Sheard, B., u. E. M. Bradburg: Progr. Biophysics molecular Biol. **20**, 187 (1970)
- [4] Hirano, K.: Bull. chem. Soc. Japan **41**, 731 (1968)
- [5] Tobin, M. C.: Spectrochim. Acta **A 25**, 1855 (1969)
- [6] Thomas, G. J.: Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **213**, 417 (1970)
- [7] Fischer, H.: Z. Chem. **1**, 234 (1961)
- [8] Fritzsche, H.: Ber. Bunsenges. physik. Chem. **68**, 459 (1964)
- [9] Sutherland, G. B. B. M., u. M. Tsuboi: Proc. Roy. Soc. [London]. Ser. A **239**, 446 (1957)
- [10] Rupprecht, A.: Biochim. biophysica Acta **199**, 277 (1970)
- [11] O'Brien, F. E. M.: J. sci. Instruments **25**, 73 (1948)
- [12] Büttner, H., u. L. Drechsel: Jenaer Rundschau **8**, 66 (1963)
- [13] Fritzsche, H., u. A. Teutsch: Jenaer Rundschau **12**, 217 (1967)
- [14] Lerman, L. S.: J. molecular Biol. **3**, 18 (1961)
- [15] Fuller, W., u. M. J. Waring: Ber. Bunsenges. physik. Chem. **68**, 805 (1964)
- [16] Bradbury, E. M., u. C. Crane-Robinson: Nature [London] **220**, 1079 (1968)
- [17] Fischer, J. J., u. O. Jardetzky: J. Amer. chem. Soc. **87**, 3237 (1965)
- [18] Shimanouchi, T., Tsuboi, M., u. Y. Kyogoku: in „Advances in Chemical Physics, Vol. VII, The Structure and Properties of Biomolecules and Biological Systems“ (Herausgeber: J. Duchesne), Wiley-Interscience, New York 1964, S. 435-498.
- [19] Fritzsche, H.: International Symposium on Macromolecular Chemistry, Prag 1965, Preprint No. 179
- [20] Fritzsche, H.: Biopolymers **5**, 863 (1967)
- [21] Tsuboi, M., Kyogoku, Y., u. T. Shimanouchi: Biochim. biophysica Acta **55**, 1 (1962)
- [22] Tsuboi, M.: in „Vibrational Spectra of High Polymers“ (Herausgeber: Natta, G., u. G. Zerbi), New York 1964, S. 125
- [23] Miles, H. T., u. J. Frazier: Biochim. biophysica Acta **79**, 216 (1964)
- [24] Tsuboi, M., u. K. Shuto: Chem. pharm. Bull. [Tokyo] **14**, 784 (1966)
- [25] Tsuboi, M.: studia biophysica, **24/25**, 9 (1970)
- [26] Rao, C. N. R.: Chemical Applications of Infrared Spectroscopy, Academic Press, New York 1963, S. 535
- [27] Fritzsche, H.: studia biophysica **1**, 273 (1966)
- [28] De Ley, J.: Actinomycetales, Jena Intern. Symp. on Taxonomy (Herausgeber: H. Prauser), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1970, S. 317
- [29] Zimmer, Ch., u. E. Sarfert: unveröffentlichte Ergebnisse (Privatmitteilung)
- [30] Sarfert, E., u. H. Venner: Z. allg. Mikrobiol. **9**, 153 (1969)
- [31] Kyogoku, Y., Tsuboi, M., Shimanouchi, T., u. I. Watanabe: Nature [London] **189**, 120 (1961)
- [32] Fritzsche, H.: Biochim. biophys. Acta [Amsterdam] **119**, 645 (1966)
- [33] Viale, G. L., u. A. F. Restelli: Tumori **53**, 323 (1967)
- [34] Biller, S., Botis, S., u. J. Gabe: Primul Simpozion National „Acizii Nucleici Biologie Activi“, Bucuresti 1967, S. 21
- [35] Maleer, V. Ya., u. M. A. Semjonov: Rep. Acad. Sci. Ukr. SSR [UdSSR], Ser. B **32**, 73 (1970)
- [36] Maleer, V. Ya., Semjonov, M. A., u. L. N. Blok: Rep. Acad. Sci. Ukr. SSR [UdSSR], Ser. B **32**, 451 (1970)

- [37] Fritzsche, H.: Symposium über Anwendung der Spektroskopie in der Medizin und Biologie, Marienbad, Rozprawy Narodniho Technického Muzea v Praze, Prag 1965, Vol. 19, S. 94
- [38] Fritzsche, H.: Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **228**, 344 (1971)
- [39] Marmar, J., u. P. P. Doty: J. molecular Biol. **5**, 109 (1962)
- [40] Schildkraut, C.: unveröffentlichte Ergebnisse, zitiert von Subirana, J. A., u. P. Doty: Biopolymers **4**, 171 (1966)
- [41] Parker, F. S., u. K. R. Bhaskar: Appl. Spectroscopy Reviews **3**, 91 (1969)
- [42] Printz, M. P., u. P. H. von Hippel: Proc. nat. Acad. Sci. USA **53**, 363 (1965)
- [43] Ostermann, L. A., Adler, V. V., Bebelaschvily, R., Saratchkina, L. P., u. Ya. M. Varshavsky: Biochemie [UdSSR] **31**, 398 (1966)
- [44] Bullock, F. J., u. D. Jardetzky: J. org. Chemistry **29**, 1988 (1964)
- [45] Fritzsche, H.: Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **149**, 173 (1967)
- [46] Fritzsche, H.: studia biophysica **4**, 53 (1967)
- [47] Varshavsky, Ya. M.: studia biophysica **4**, 7 (1967)
- [48] Hofmann, E.: Eiweiße und Nucleinsäuren als biologische Makromoleküle, 2. Aufl., Akademie-Verlag, Berlin 1970, S. 146
- [49] Fjedorov, N. A., Kotor, N. N., u. E. F. Tikhonov: Fragen med. Chem. [UdSSR] **16**, 441 (1970)
- [50] Wechter, W. J.: Collect. Czechoslov. chem. Commun. **35**, 2003 (1970)
- [51] Shelton, K. K., u. J. M. Clark: Biochemistry **6**, 2735 (1967)
- [52] Doppler-Bernardi, F., u. G. Feisenfeld: Biopolymers **8**, 733 (1969)
- [53] Searcy, G. D.: Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **166**, 360 (1968)
- [54] Zimmer, Ch.: Z. Chem. **11**, 441 (1971)
- [55] Fritzsche, H.: unveröffentlichte Ergebnisse, zitiert von Venner, H., u. Ch. Zimmer: Biopolymers **4**, 321 (1966)
- [56] Eichhorn, G. L., Clark, P., u. E. D. Becker: Biochemistry **5**, 245 (1966)
- [57] Fritzsche, H.: studia biophysica **10**, 31 (1968)
- [58] Fritzsche, H., u. Ch. Zimmer: European J. Biochemistry **5**, 42 (1968)
- [59] Zimmer, Ch., Luck, G., Fritzsche, H., u. H. Triebel: Biopolymers **10**, 441 (1971)
- [60] Fritzsche, H.: studia biophysica **21/22**, 315 (1970)
- [61] Courtois, Y., Fromageot, P., u. W. Guschlbauer: European J. Biochemistry **6**, 493 (1968)
- [62] Ropars, C., u. R. Viory: J. Chim. physique Physico-Chim. biol. **62**, 408 (1965)
- [63] Fritzsche, H., Tresselt, D., u. Ch. Zimmer: Experientia, im Druck
- [64] Drozdov-Tikhomirov, L. N., u. L. I. Kikoi: Biophysik [UdSSR] **12**, 407 (1957)
- [65] Tu, A. T., u. Ch. G. Friederich: Biochemistry **7**, 4367 (1968)
- [66] Miles, H. T.: Proc. nat. Acad. Sci. USA **47**, 791 (1961)
- [67] Miles, H. T., Howard, F. B., u. J. Frazier: Science [Washington] **142**, 1458 (1963)
- [68] Pople, J. A., Schneider, W. G., u. H. J. Bernstein: High-resolution Nuclear Magnetic Resonance, McGraw-Hill, New York, Toronto, London 1959, S. 207
- [69] Fritzsche, H.: Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **224**, 608 (1970)
- [70] Eichhorn, G. L., u. E. Tarien: Biopolymers **5**, 273 (1967)
- [71] Cohn, M., u. T. R. Hughes: J. biol. Chemistry **237**, 176 (1962)
- [72] Blumberg, W. E., Eisinger, J., Favaz-Estrup, F., u. R. G. Shulman: Bull. Amer. phys. Soc. **8**, 199 (1963)
- [73] Shulman, R. G., u. H. Sternlicht: J. molecular Biol. **13**, 952 (1965)
- [74] Eisinger, J., Favaz-Estrup, F., u. R. G. Shulman: J. chem. Physics **42**, 43 (1965)
- [75] Shulman, R. G., Sternlicht, H., u. B. Wyluda: J. chem. Physics **43**, 3116 (1965)
- [76] Sternlicht, H., Shulman, R. G., u. E. W. Anderson: J. chim. Physics **43**, 3123 (1965)
- [77] Fritzsche, H.: studia biophysica **24/25**, 299 (1970)
- [78] Hartmann, M.: Dissertation, Math.-Nat. Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena (1970)
- [79] Fritzsche, H., u. M. Hartmann: Z. Chem. **11**, 69 (1971)
- [80] Kessler, H.: Angew. Chem. **82**, 237 (1970)
- [81] Lones, G. W.: Amer. Rev. Respiratory Disease **102**, 128 (1970)
- [82] Luedin, P. O.: Rev. mod. Physics **35**, 724 (1963)
- [83] Zimmermann, H.: Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. **65**, 821 (1961)
- [84] Jakobsen, R. J., u. J. W. Brasch: Spectrochim. Acta **21**, 1753 (1965)
- [85] Blinc, R., u. D. Hadži: in „Hydrogen Bonding“ (Herausgeber: D. Hadži), Pergamon Press, London 1959, S. 147
- [86] Somorjai, R. L., u. D. F. Hornig: J. chem. Physics **36**, 1980 (1962)
- [87] Novak, A., u. A. Lautie: Nature [London] **216**, 1202 (1967)
- [88] Fritzsche, H.: Experientia, **27**, 507 (1971)
- [89] Fritzsche, H.: Spectrochim. Acta **22**, 1139 (1966)
- [90] Fritzsche, H.: unveröffentlichte Messungen
- [91] Herzberg, G.: Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules, Van Nostrand, New York 1960, S. 215
- [92] Kyogoku, Y., Higuchi, S., u. M. Tsuboi: Spectrochim. Acta **23 A**, 969 (1967)
- [93] Fritzsche, H.: vorgetragen auf der „3. Bulgarischen Spektroskopischen Konferenz“, Oktober 1968, Varna
- [94] Lisowski, R., u. K. L. Wierzechojski: Photochem. Photobiol. **11**, 327 (1970)
- [95] Kondo, Y., u. B. Witkop: J. Amer. chem. Soc. **91**, 5264 (1969)
- [96] Téoule, R., Cadet, J., u. J. Ulrich: C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. **270**, 362 (1970)
- [97] De Boer, G., u. H. E. Johns: Biochim. biophysica Acta **204**, 18 (1970)
- [98] Fujita, H., u. H. Yamazaki: Bull. chem. Soc. Japan **43**, 1177 (1970)
- [99] Dugaiczek, A.: Biochemistry **9**, 1557 (1970)

[100] Hruska, F. E., Grey, A. A., u. I. C. P. Smith: J. Amer. chem. Soc. **92**, 4088 (1970)
 [101] Blackburn, B. J., Grey, A. A., Smith, I. C. P., u. Hruska, F. E.: Canad. J. Chem. **48**, 2866 (1970)
 [102] Hart, P. A., u. J. P. Davis: Biochem. biophysic. Res. Commun. **34**, 733 (1969)
 [103] Hart, P. A., u. J. P. Davis: J. Amer. chem. Soc. **91**, 512 (1969)
 [104] Ts'o, P. O. P.: Ann. New York Acad. Sci. **153**, 785 (1969)
 [105] Ts'o, P. O. P., Kondo, N. S., Robins, R. K., u. A. D. Broom: J. Amer. chem. Soc. **91**, 5625 (1969)
 [106] Thakkar, A. L., Tensmeyer, L. G., Hermann, R. B., u. W. L. Wilham: J. chem. Soc. [London], Sect. D, **1970**, 524
 [107] Chan, S. I., u. J. H. Nelson: J. Amer. chem. Soc. **91**, 168 (1969)
 [108] Bangerter, B. W., u. S. I. Chan: J. Amer. chem. Soc. **91**, 3910 (1969)
 [109] Chan, S. I., u. G. P. Kreishman: J. Amer. chem. Soc. **92**, 1102 (1970)
 [110] Blears, D. J., u. S. S. Danyluk: Biopolymers **5**, 535 (1967)
 [111] Arison, B. H., u. K. Hoogsteen: Biochemistry **9**, 3976 (1970)
 [112] Crothers, D. M.: unveröffentlichte Messungen (Privatmitteilung)
 [113] Neumark, R. A., u. Ch. R. Cantor: J. Amer. chem. Soc. **90**, 5010 (1968)
 [114] Katz, L.: J. molecular Biol. **44**, 279 (1969)
 [115] Brown, D. M., u. M. J. E. Hewlins: Nature [London] **221**, 5181 (1969)
 [116] Brahm, J., Maurizot, J. C., u. J. Pilet: Biochim. biophysica Acta **186**, 110 (1969)
 [117] Thomas, G. J., u. M. Spencer: Biochim. biophysica Acta **179**, 360 (1969)
 [118] Cotter, R. I., u. W. B. Gratzner: Nature [London] **221**, 154 (1969)
 [119] Cotter, R. I., u. W. B. Gratzner: European J. Biochemistry **8**, 352 (1969)
 [120] Backer, J. M., u. Yu. N. Molin: Biophysik [UdSSR] **14**, 740 (1969)
 [121] Smith, I. C. P., Yamane, T., u. R. G. Shulman: Canad. J. Biochem. **47**, 480 (1969)

[122] Schweizer, M. P.: Biochem. biophysic. Res. Commun. **36**, 871 (1969)
 [123] Webb, S. J., u. R. Bather: Physics Med. Biol. **15**, 271 (1970)
 [124] Falk, M., Poole, A. G., u. C. G. Goymer: Canad. J. Chem. **48**, 1536 (1970)
 [125] Meadows, D. H., Roberts, G. C. K., u. O. Jardetzky: J. molecular Biol. **45**, 491 (1969)
 [126] Backer, J. M., Molin, Yu. N., u. A. S. Sorokin: Biochem. biophysic. Res. Commun. **38**, 871 (1970)
 [127] Farrar, T. C.: Analytic. Chem. **42**, 109 A (1970)
 [128] Anonym: Nature [London] **225**, 1000 (1970)
 [129] Dorman, D. E., u. J. D. Roberts: Proc. nat. Acad. Sci. USA **65**, 19 (1970)
 [130] Jones, A. J., Winkley, M. W., Grant, D. M., u. R. K. Robins: Proc. nat. Acad. Sci. USA **65**, 27 (1970)
 [131] Jones, A. J., Grant, D. M., Winkley, M. W., u. R. K. Robins: J. Amer. chem. Soc. **92**, 4079 (1970)
 [132] Jones, A. J., Grant, D. M., Winkley, M. W., u. R. K. Robins: J. phys. Chem. **74**, 2684 (1970)
 [133] Tsuboi, M., Takahashi, S., Kyogoku, Y., Hayatsu, H., u. T. Ukita: Science [Washington] **166**, 1504 (1969)
 [134] James, T. L., u. J. H. Noggle: Proc. nat. Acad. Sci. USA **62**, 644 (1969)
 [135] Sprinz, H., Döllstädt, R., u. G. Hübner: Biopolymers **7**, 447 (1969)
 [136] Cohn, M., Danchin, A., u. M. Grunberg-Manago: J. molecular Biol. **39**, 199 (1969)
 [137] Danchin, A.: J. theoret. Biol. **25**, 317 (1969)
 [138] Danchin, A., u. M. Gueron: European J. Biochemistry **16**, 532 (1970)
 [139] Griffith, O. H., u. A. S. Waggoner: Accounts chem. Res. **2**, 17 (1969)
 [140] Hoffman, B. M., Schofield, P., u. A. Rich: Proc. nat. Acad. Sci. USA **62**, 1195 (1969)

eingegangen am 18. Januar 1971

ZCA 3387

Kurze Originalmitteilungen

Dienoligomerisierung;¹⁾

3-Methylundeca-(1,5,7,9)-tetraen — ein Butadien-Trimeres aus der kobalt-komplekxkatalysierten Oligomerisierung

Die Co-komplekxkatalysierte Oligomerisierung des Butadiens führt recht selektiv zu den linearen Dimeren 3-Methylheptatrien-(1,4,6) und n-Octatrien-(1,3,6) [1].

Dabei treten auch höhere Oligomere, vorwiegend Trimere und Tetramere, schließlich auch Polymere auf.

Von W. Duck et al. [2] wurden aus der Trimerenfraktion eines durch ein halogenhaltiges Co-Katalysatorsystem gewonnenen Oligomerisates drei neue Trimere isoliert und als 3,6-Dimethyl-deca-(1,4,7,9)-tetraen (1), 3,8-Dimethyldeca-(1,4,6,9)-tetraen (2) und 3-Methyl-undeca-(1,5,8,10)-tetraen (3) (Hauptkomponente mit 70%) erkannt.

V. A. Krol et al. [3] wiesen bei der durch $\text{TiCl}_4/\text{Al}(\text{i-Bu})_3$ katalysierten Butadien-Oligomerisierung das Dodeca-(2,4,6,10)-tetraen (4) als erstes Trimeres mit konjugierter Trienstruktur nach, nachdem bereits 1965 M. Hidai et al. [4] über das n-Dodeca-(1,3,6,10)-tetraen (5) berichtet hatten (vgl. auch [5]). 5 wird gemeinsam mit zwei weiteren, verzweigten Dodecatetraenen auch in einer Patentschrift [6] erwähnt.

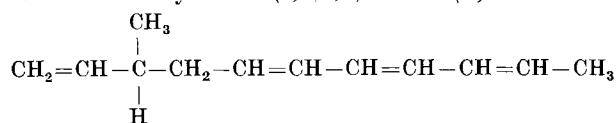
Wir oligomerisierten Butadien mit einem Katalysatorsystem aus Kobalt-tris-acetylacetonat und Aluminiumtriäthyl im kontinuierlichen Laborreaktor bei 60–65°C.

Neben den bekannten Dimeren entstanden etwa 10% Trimere, außerdem höhere Oligomere und Polymere. Aus der destillativ abgetrennten Trimerenfraktion konnten durch präparative Gaschromatographie die beiden Hauptkomponenten abgetrennt werden.

Das mit kürzerer Retentionszeit im Gaschromatogramm erscheinende Trimer ist identisch mit 3, wie der Vergleich der IR- und NMR-Spektren [2] ergab.

Die zweite Verbindung erhielten wir auch destillativ (Sdp.₁ 61–65°C, n_D^{20} = 1,5371) in reiner Form; sie ist zu etwa 70% in der Trimerenfraktion enthalten.

Nach den spektroskopischen Untersuchungen handelt es sich um 3-Methylundeca-(1,5,7,9)-tetraen (6)



¹⁾ I. Mitteilung

Das Massenspektrum von 6 ($M^+ = 162$; $M + 1 = 13\%$ von M^+) erbringt die Summenformel $\text{C}_{12}\text{H}_{18}$ und damit die Verknüpfung dreier Moleküle Butadien. Die Bruchstückbildung erfolgt bevorzugt am tertiären Kohlenstoff, wie durch die Fragmente 147 ($M - \text{CH}_3$), 134 und 133 ($M - 28$, $M - 29$) bzw. 107 ($M - 55$) und 55 ($M - 107$) belegt ist. Basispeak ist $M = 79$.

Das UV-Absorptionsmaximum von 267 nm wie auch der hohe Brechungsindex weisen auf eine konjugierte Trienstruktur hin, vgl. [3].

Nach dem IR-Spektrum ist die Anwesenheit von cis-1,2-(675, 720 cm^{-1}) und trans-1,2-disubstituierten Doppelbindungen (970 cm^{-1}), einer Vinylgruppe (920, 1000, 3020, 3082 cm^{-1}) sowie CH_3 von (1380, 2870, 2970 cm^{-1}) und CH_2 (2845, 2920 cm^{-1}) sicher zu indizieren.

Aus den relativen Signalintensitäten des NMR-Spektrums geht hervor, daß 9 Protonen an sp^3 -Kohlenstoff ($\delta = 0,85 \dots 2,50$ ppm) und ebenfalls 9 Protonen ($\delta = 4,60 \dots 6,50$ ppm) an sp^2 -Kohlenstoff gebunden sind.

Bei $\delta = 0,97$ ppm liegt das Dublett ($J = 7$ Hz, 3 H) der am tertiären sp^3 -Kohlenstoff befindlichen Methylgruppe. Die allylständige Methylgruppe verursacht bei $\delta = 1,71$ ppm ein Dublett ($J = 7$ Hz, 3 H), dessen Lage bei tieferem Feld ($\text{CH}_3-\text{C}=\text{sonst.}$ bei etwa 1,60 ppm) einen Hinweis auf das Konjugationssystem gibt.

Im Bereich $\delta = 1,80 \dots 2,60$ ppm (3 H) fallen die Multipletts der allylständigen CH_2 -Gruppe und des tertiären Protons zusammen. Die Nachbarschaft eines asymmetrischen Kohlenstoffatoms und einer Doppelbindung, an der möglicherweise cis-trans-Isomerie vorliegt, erklärt, warum man nur die Andeutung des zu erwartenden CH_2 -Triplets findet.

Zwischen $\delta = 4,60$ und 5,05 liegt der charakteristische AB-Teil des ABM-Spektrums der isolierten Vinylgruppe [7].

Ein breites Multiplett im Bereich $\delta = 5,10 \dots 6,50$ ppm entspricht 7 Protonen; die Lage bei tiefem Feld des 4 Protonen entsprechenden Teiles der Signalgruppe bei $\delta = 5,75 \dots 6,50$ ppm beweist die Anwesenheit vier „innenständiger“, also stärker entschirmter Protonen eines Trien-Konjugationssystems.

Eine ergänzende Kapillar-GC-Untersuchung zeigte, daß die auf einer normalen analytischen Säule einheitlich erscheinende Verbindung 6 aus zwei Komponenten (1:1) besteht. Nach Hydrierung zum gesättigten Kohlenwasserstoff (NMR-