

Einsichten in Stabilität und Replikation der DNA durch Nachahmung ihrer Struktur und Funktion

Eric T. Kool,* Juan C. Morales und Kevin M. Guckian

Die physikalischen und chemischen Eigenschaften, durch die die DNA ihre Funktionen in der Zelle erfüllen kann, werden seit mehreren Jahrzehnten untersucht. Fortschritte bei der Synthese und der Manipulation der DNA haben vor allem in den letzten fünfzehn Jahren einen raschen Fortschritt ermöglicht. Einer der am weitesten verbreiteten chemischen Ansätze zur Untersuchung von Wechselwirkungen unter Beteiligung der DNA war der Einsatz von Basenanaloga, in denen funktionelle Gruppen hinzugefügt, entfernt, blockiert oder anders angeordnet sind. Wir beschreiben hier eine andere Strategie, nach der die polaren natürlichen DNA-Basen durch unpolare aromatische Moleküle gleicher

Größe und Form ersetzt werden. Dies ermöglicht eine Bewertung der polaren Wechselwirkungen (wie der Wasserstoffbrückenbindungen) ohne oder mit nur geringfügiger Störung durch sterische Effekte. Wir haben diese unpolaren Nucleosid-Isostere als Sonden für nichtkovalente Wechselwirkungen wie DNA-Basenpaarungen und Protein-DNA-Erkennungen eingesetzt. Dabei haben wir herausgefunden, dass die Selektivität der Paarung bei den natürlichen Basenpaaren zwar auf den Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen beruht, dass es aber möglich ist, neue Basen zu entwerfen, die sich selektiv und stabil ohne Wasserstoffbrückenbindungen paaren. Außerdem wurde an DNA-Polymerasen

die Bedeutung der Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen für die enzymatische DNA-Replikation untersucht. Überraschenderweise sind diese Wasserstoffbrückenbindungen für eine effiziente enzymatische Synthese eines Basenpaares nicht nötig; allein durch sterische Effekte ist ein erhebliches Maß an Selektivität möglich. Diese Ergebnisse können einen erheblichen Einfluss auf die Untersuchungen der grundlegenden biomolekularen Wechselwirkungen und auf den Entwurf neuer, funktionell aktiver Biomoleküle haben.

Stichwörter: Basenpaarung • DNA-Polymerase • Nucleobasen • Wasserstoffbrücken

1. Einleitung

1.1. Überblick

Wir beschreiben im Folgenden eine Reihe von Untersuchungen mit einer neuen Klasse von Nucleosidmimetika. Diese Moleküle, die wir unpolare Nucleosid-Isostere nennen, imitieren die Form der natürlichen Nucleoside und Nucleotide so gut wie möglich, können aber keine Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen bilden. Dadurch werden sie besonders wertvoll als Werkzeuge für die mechanistische Untersuchung der Bedeutung dieser nichtkovalenten Bindungen für die verschiedenen Funktionen der Nucleinsäuren.

Die Untersuchungen haben einige überraschende Erkenntnisse zum Mechanismus erbracht, nach dem die DNA-Polymerasen einen DNA-Strang replizieren. Dies hat möglicherweise wichtige Auswirkungen auf die wissenschaftliche Grundlagenforschung über die biochemische und biophysikalische Struktur und Funktion und fließt möglicherweise auch in praktische Anwendungen ein. In diesem Aufsatz werden wir zunächst kurz die Grundstruktur der DNA und die Funktionen, die sie in der Zelle wahrnimmt, skizzieren. Dann beschreiben wir, wie Struktur und Funktionen der DNA erfolgreich imitiert werden können, wenn man einfache sterische Randbedingungen beachtet. Und schließlich werden wir die Auswirkungen dieser Arbeit und mögliche zukünftige Ausrichtungen der Forschungsaktivitäten diskutieren.

[*] Prof. E. T. Kool,^[+] Dr. J. C. Morales,^[+] K. M. Guckian
Department of Chemistry, University of Rochester
Rochester, NY 14627 (USA)

[+] Gegenwärtige Adresse:
Department of Chemistry, Stanford University
Palo Alto, CA 94305-5080
Fax: (+1) 650-725-0259
E-mail: kool@leland.stanford.edu

1.2. Struktur und Funktionen der DNA

Die dreidimensionale Struktur der DNA-Doppelhelix wurde vor mehr als vier Jahrzehnten von Watson und Crick

aufgeklärt.^[1] Die zentralen Merkmale dieser Struktur sind ein anionisches Zucker-Phosphat-Rückgrat, das sich um die Außenseite der zylindrischen Helix windet, und neutrale Nucleobasen im Zentrum der Helix.^[2] Die gepaarten Basen stehen etwa senkrecht zur Helixachse und sind über van-der-Waals-Wechselwirkungen gestapelt. Durch die rechtsläufige Windung des Rückgrats (in der B-Form der DNA) entstehen zwei Furchen in der Helix (die große und die kleine Furche), die durch das Zucker-Phosphat-Rückgrat (das als die Wände der Furchen dient) und die Kanten der Basen (die als Boden fungieren) begrenzt werden.

Die chemischen Reste, aus denen sich die Primärstruktur der DNA zusammensetzt, sind in Schema 1 gezeigt. Das Rückgrat enthält neben den Phosphodiestergruppen 2'-Desoxyribosester, die die DNA-Basen tragen und ausrichten. Es ist insgesamt wegen der negativen Ladung an jeder Phosphodiestergruppe bei neutralem pH-Wert hoch polar. Die Nucleobasen sind aromatische stickstoffhaltige Heterocyklen: monocyclische Pyrimidine und bicyclische Purine. Sie sind entlang ihrer Kanten im Allgemeinen recht polar, da sie mehrfach, z.B. mit Amino-, Imino- und Carbonylgruppen substituiert sind.

Die primäre Funktion der DNA ist das Speichern genetischer Information; die drei Milliarden Basenpaare in jeder menschlichen Zelle kodieren die Synthese von etwa 100 000 Proteinen. Es ist eindeutig von entscheidender Bedeutung, dass nicht nur die Proteine fehlerfrei synthetisiert werden, sondern auch, dass die genetische Information exakt von Generation zu Generation innerhalb einer Art weitergegeben wird. Im Mittelpunkt dieser Fähigkeiten steht die Doppelhelixstruktur der DNA. Ihre antiparallele, C_2 -symmetrische Struktur mit komplementären, durch Wasserstoffbrücken verbundenen Basenpaaren ist ein außergewöhnlich effektives Mittel zur Speicherung und Weitergabe der kodierten Information.

DNA dient in einer Zelle auch als Strukturelement, an dem sich Multiproteinkomplexe zusammenlagern. Dieses wasserlösliche Gerüst ist lokal betrachtet inhärent steif, doch kann der Duplex durch die Bindungsenergie der Proteine verformt werden, indem sie gebogen, stärker aufgewunden oder entspiralisiert wird. Außerdem machen sich die Chemiker gegenwärtig die Struktureigenschaften der DNA zunutze, um künstliche Gerüste für Anwendungen in den Materialwissenschaften und der Biomedizin zu synthetisieren.^[3-11]

Eric T. Kool ist Professor für Chemie an der Stanford University in Stanford, CA (USA). Er promovierte 1988 als NFS Predoctoral Fellow an der Columbia University in der Arbeitsgruppe von Professor Ronald Breslow und setzte seine Laufbahn am California Institute of Technology als NIH Postdoctoral Fellow bei Professor Peter B. Derwan fort. 1990 wechselte er an die University of Rochester in New York und 1999 an die Stanford University. Sein Forschungsinteresse liegt im Bereich der



E. T. Kool



J. C. Morales

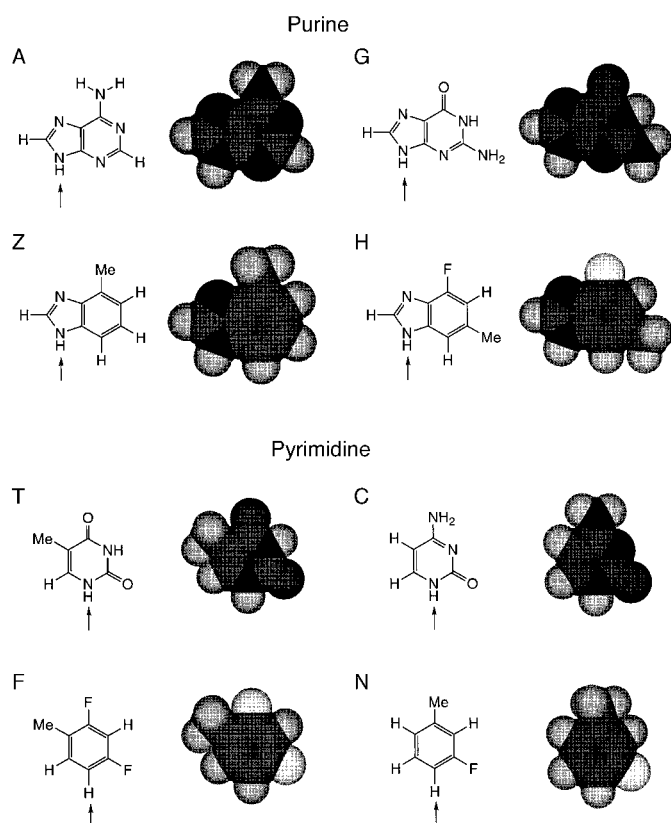


K. M. Guckian

bioorganischen Chemie und hier unter anderem beim Entwurf von Molekülen, die Sequenz und Struktur von DNA und RNA erkennen können, und von Molekülen, die biologische Funktionen imitieren können. Seine Arbeiten hat er bislang in mehr als 70 Forschungspublikationen veröffentlicht, und er wurde zu über 120 Vorträgen eingeladen. Er erhielt unter anderem den Arthur C. Cope Scholar Award der American Chemical Society, ein Stipendium der Alfred P. Sloan Foundation, den Young Investigator Award des US Office of Naval Research, den Young Investigator Award des US Army Research Office, den Young Investigator Award der Arnold & Mabel Beckman Foundation, einen American Cyanamid Faculty Award und den Camille and Henry Dreyfus Foundation Teacher-Scholar Award.

Juan C. Morales, geboren 1969 in Madrid (Spanien), erhielt seinen B.Sc. in Chemie an der Universidad de Alcalá und promovierte 1996 bei Professor S. Penadés an der Universidad Autónoma de Madrid mit einer am Instituto de Química Orgánica (C.S.I.C.) angefertigten Arbeit über die molekulare Erkennung von Kohlenhydraten durch makrocyclische Rezeptoren. Gegenwärtig ist er Postdoc in der Arbeitsgruppe von Prof. E. T. Kool. Seine Forschungsinteressen konzentrieren sich auf das Verständnis der molekularen Erkennung in DNA-Protein- und Kohlenhydrat-Protein-Systemen und ihre Anwendung auf die Entwicklung von Wirkstoffen.

Kevin M. Guckian, geboren in Rochester, NY (USA), erhielt 1995 seinen B.Sc. in Chemie an der Oswego State University. Danach ging er zu Prof. E. T. Kool an die University of Rochester, wo er die Struktur und Funktion von DNA mit unpolaren Basenanaloga untersucht. Seine Forschungsinteressen konzentrieren sich auf Protein-DNA-Wechselwirkungen.



Schema 1. Chemische Formeln und raumfüllende Modelle der vier natürlichen Basen und der ihnen entsprechenden unpolaren Isostere. Die Pfeile geben die Position an, an der der Desoxyribose-Residuum gebunden ist.

1.3. Prüfung der Paradigmen über DNA-Stabilität und -Replikation

In diesem Aufsatz sollen einige grundlegende Fragen zur DNA-Struktur und -Funktion diskutiert werden. Zur Beantwortung solcher Fragen setzen Chemiker zunächst Nucleosidanaloge ein. Allerdings weisen die meisten bekannten Analoga der natürlichen DNA-Basen wichtige Strukturunterschiede zu ihren natürlichen Verwandten auf. Sogar eine scheinbar kleine Störung wie die Alkylierung einer Base verursacht weitreichende sterische Veränderungen des Moleküls. Beispielsweise kann die Methylierung einer Gruppe, die an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist, die Affinität eines Proteins zur DNA verringern; dies kann jedoch entweder am Verlust der Wasserstoffbrückenbindung oder an sterischer Abstoßung liegen.

Aus diesem Grund entwarfen wir eine Reihe von Verbindungen, die die DNA-Basenstruktur nachahmen sollten, ohne allerdings Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen bilden zu können.^[12, 13] Diese „unpolaren Nucleosid-Isostere“ (Schema 1) sind einfache und allgemein präparativ leicht zugängliche Verbindungen. In unserem Entwurf wurden Pyrimidinbasen durch substituierte Benzole und Purine durch Indole oder Benzimidazole ersetzt. Von den vier gezeigten Verbindungen (Schema 1) halten wir zwei für nahezu perfekte Isostere (**H** als Analogon von **G** und **F** als Analogon von **T**). **N** und **Z** halten wir für weniger ideal, da in diesen

Verbindungen ein Stickstoffatom im aromatischen Ring durch die sterisch voluminösere CH-Gruppe ersetzt ist. Dies vergrößert die Ausdehnung des Moleküls an dieser Position um etwa 0.7 Å. Dennoch sind dies die bestmöglichen verfügbaren Isostere, die keine Wasserstoffbrückenbindungen bilden können.

1.4. Mögliche Ergebnisse

Die beabsichtigte Verwendung für diese Moleküle bestand darin, sie anstelle der natürlichen Nucleoside in die DNA einzubauen und zu untersuchen, ob sie deren Funktion übernehmen. Ein negatives Ergebnis dieses Experiments bedeutet, dass dem molekularen Imitat alle Eigenschaften fehlen, um die Funktion der Base zu übernehmen. Allerdings ist es manchmal schwierig, aus einem negativen Ergebnis vertrauenswürdige Schlussfolgerungen zu ziehen, denn im Allgemeinen wird bei der Veränderung eines Moleküls mehr als eine Eigenschaft beeinträchtigt.

Nützlicher und wichtiger ist wahrscheinlich das zweite mögliche Ergebnis, die Erhaltung der Aktivität. Beispielsweise könnte die Entfernung einer Gruppe, die an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist, nur zu einem geringen Verlust an Stabilität oder Aktivität führen. In diesem Fall könnte man eher darauf schließen, dass die Wasserstoffbrückenbindung energetisch betrachtet für die Stabilisierung eines Grund- oder Übergangszustandes wahrscheinlich nicht wichtig war. Ähnliche Untersuchungen werden bereits seit Jahren mit ortsspezifischer Mutagenese bei Proteinen durchgeführt.

Grundlegende Lehrsätze der Wissenschaft werden zu Paradigmen, wenn sie wiederholt überprüft und in Frage gestellt worden sind. Hier stellen wir einige dieser Fragen erneut.

Sind Wasserstoffbrückenbindungen für die Stabilisierung der DNA-Helix notwendig? Seit Watson und Crick die Duplexstruktur der DNA aufgeklärt haben, ist allgemein akzeptiert, dass die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen entscheidend für die Stabilität der DNA sind. Ein Watson-Crick-Basenpaar hat zwei oder drei solcher Bindungen, und diese tragen etwa 0.5–1.8 kcal mol⁻¹ pro DNA-Basenpaar zur Stabilisierung bei.^[14–17] Die Unsicherheiten bei diesem Wert rühren daher, dass das experimentelle Messergebnis stark von der molekularen Umgebung abhängt. Natürlich spiegelt sich in dieser relativ niedrigen Stabilisierungsenergie die Konkurrenz mit Wasser wider, denn der Bruch jeder Wasserstoffbrückenbindung in einem Basenpaar (durch die Trennung der Basen) bedeutet auch die gleichzeitige Neubildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit Wassermolekülen. In der Gasphase, wo eine solche Konkurrenz fehlt, lässt sich experimentell eine Stabilisierung von 6–7 kcal mol⁻¹ für einzelne Wasserstoffbrückenbindungen zwischen funktionellen Gruppen bestimmen, wie sie auch in der DNA vorkommen.^[18, 19] Obwohl die DNA bereits seit Jahrzehnten untersucht wird, ist die Rolle der Wasserstoffbrückenbindungen bei der Stabilisierung der Helix und bei der selektiven Bildung von Basenpaaren noch immer unklar.

Ist die Stapelung der aromatischen Basen weniger wichtig für die Helixstabilität als die Wasserstoffbrückenbindungen? Im Allgemeinen wurde die Zahl der Wasserstoffbrückenbindungen in den Basenpaaren bei der Erklärung der DNA-Funktion stärker beachtet als die Stapelung der Basen. In der B-DNA besteht allerdings zwischen benachbarten Basenpaaren eine Kontaktfläche von etwa 115 \AA^2 durch Überlappung der π -Systeme (Abbildung 1). Die Bildung einer Helix aus einem Zufallsknäuel bedeutet also, dass eine Fläche von bis zu 230 \AA^2 des π -Elektronensystems pro Basenpaar dem Lösungsmittel entzogen wird, wenn man annimmt, dass im Einzelstrang keine Basenstapelung vorkommt. Die spezifischen nichtkovalenten Kräfte, die diese Stapelung stabilisieren, sind nur schlecht verstanden. Obwohl permanente elektrostatische Effekte, induzierte Dipol-Anziehungen und solvophobe Effekte alle eine Rolle spielen können, sind deren relative Beiträge noch nicht klar.^[20–26]

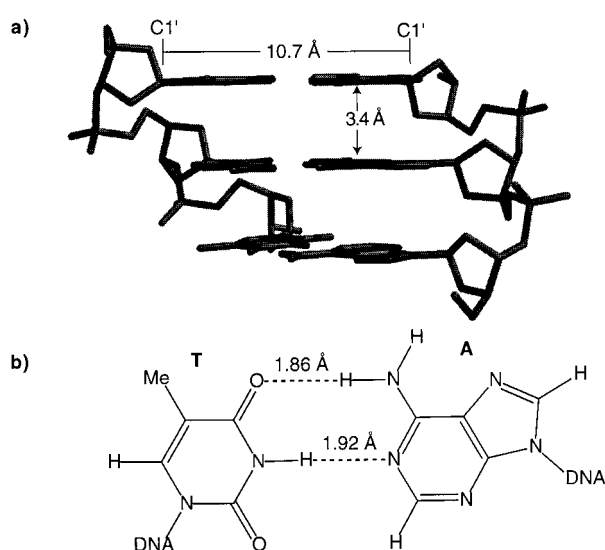
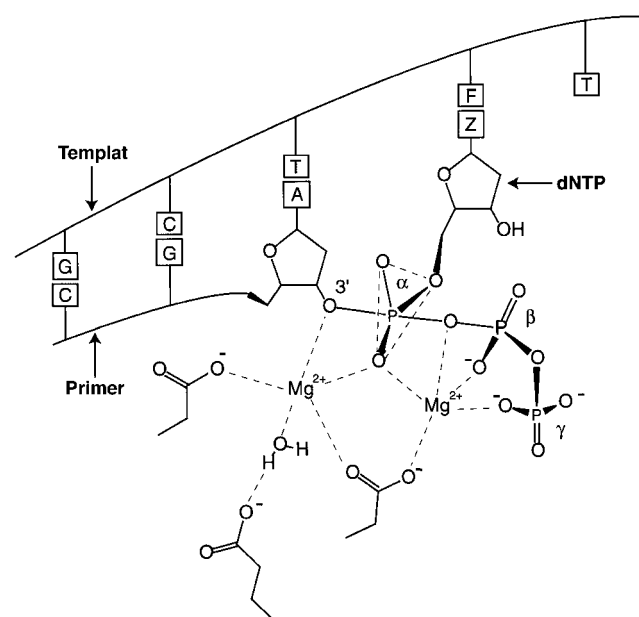


Abbildung 1. a) Modell einer DNA-Helix aus drei Basenpaaren in der B-Form mit den Abständen zwischen den Strängen und Basen. b) Watson-Crick-A-T-Basenpaar.

Sind Wasserstoffbrückenbindungen für die Spezifität der Basenpaarung notwendig? Wasserstoffbrückenbindungen werden weithin für einen der wichtigsten Faktoren für die Spezifität biomolekularer Erkennung gehalten. Wenn man sich die bislang vorliegenden Daten über natürliche und modifizierte DNAs anschaut, wird man dazu neigen, dieses Paradigma zu unterstützen. So sind z.B. synthetische DNA-Duplexe vielfach hinsichtlich der Thermodynamik der Stabilisierung hin untersucht worden. Wenn ein komplementäres Basenpaar zu einem nichtkomplementären mutiert wird (Fehlpaarung), ist die Einbuße an Stabilisierungsenergie recht groß. So destabilisiert eine T-C-Fehlpaarung die Helix um etwa $3.2\text{--}5.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ gegenüber einem korrekten T-A-Paar.^[27–29] Wenn allerdings nur die Wasserstoffbrückenbindungen in Fehlpaarungen wie T-C unterbrochen werden, warum wirkt dies so destabilisierend auf die DNA? Vernünftigerweise kann man annehmen, dass die Basenstapelung trotz Fehlpaarung als Stabilisierungsfaktor erhalten bleibt. Eine mögliche Antwort auf diese Frage könnte sein, dass das

T-C-Paar die Struktur der DNA über den Bereich des einen Basenpaares hinaus verzerrt. Und tatsächlich lassen Strukturuntersuchungen von fehlgepaarten Basen in der DNA wie G-T und T-T^[30–32] vermuten, dass sie sehr wohl die DNA verzerren. Sie sind dennoch durch Wasserstoffbrücken gebunden; um dazu allerdings die notwendige Orientierung einnehmen zu können, wechselt das Paar meist in eine Anordnung, die von der normaler Paare abweicht und durch die das DNA-Rückgrat ebenfalls verzerrt wird.

Sind Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen für die DNA-Replikation essentiell? Die enzymatische Replikation der DNA läuft mit hoher Geschwindigkeit (ca. 20–1000 Nucleotide pro Sekunde) und sehr großer Genauigkeit (mit nur einem Fehler je $10^3\text{--}10^5$ Nucleotidverknüpfungen) ab.^[33–40] Der Gedanke, dass Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen vorwiegend, vielleicht sogar allein, für diese Effekte verantwortlich sind, wird in der Biochemie und der Molekularbiologie seit Jahrzehnten gelehrt. Weit verbreitete Lehrbücher zu diesem Thema zitieren fast immer die hohe Spezifität der Wasserstoffbrückenbindungen, um die Zuverlässigkeit der DNA-Synthese zu erklären.^[41, 42] Wie zuvor beschrieben, sind allerdings verschiedene Kräfte an der Stabilisierung der DNA in Abwesenheit von Enzymen beteiligt. Vernünftigerweise darf angenommen werden, dass diese auch die Stabilität des Übergangszustandes der polymerasekatalysierten Reaktion beeinflussen (Schema 2). Welches sind also neben den Wasserstoffbrückenbindungen die



Schema 2. Darstellung des Übergangszustandes der DNA-Polymerase-Reaktion. Eine detaillierte Beschreibung des Zwei-Metallionen-Mechanismus findet sich bei Steitz et al.^[142, 143]

Auswirkungen der permanenten dipolaren oder elektrostatischen Anziehung bei der Basenpaarung durch das neu hinzukommende Nucleotid? Welchen Einfluss hat die Solvation auf diesen Prozess? Und vor allem, welchen Effekt haben sterischer Anspruch und Form im aktiven Zentrum der Polymerase?

2. Nachahmung der Primärstruktur

2.1. Form und Konformation

Um solche Fragen direkter angehen zu können, haben wir unpolare Nucleosid-Isostere untersucht, die die Form der natürlichen Basen besser nachahmen als die bislang bekannten Analoga (Schema 1). Die Strukturen dieser Nucleoside wurden rechnerisch und experimentell untersucht. Röntgenstrukturanalysen von dF und dZ wurden zusammen mit einem Vergleich mit den natürlichen Gegenstücken dT und dA publiziert.^[43, 44] Die Struktur von dF^[43] im Kristall ist der von Thymidin^[45, 46] bemerkenswert ähnlich (Abbildung 2). Die beiden Verbindungen haben identische Zuckerfurchen und sehr ähnliche Glycosid-Torsionswinkel. Die Struktur von dZ unterscheidet sich etwas von der von Desoxyadenosin im festen Zustand.^[44] Die beiden Zucker liegen in verschiedenen Konformationen vor (obwohl beide South-Konformere sind), und die Orientierung der Glycosidbindung bei dZ ist *syn*, während sie bei dA *anti* ist.

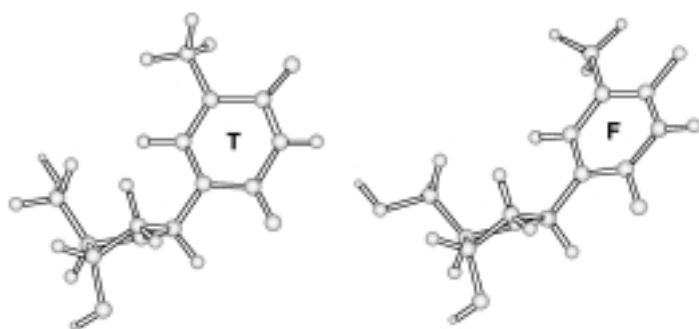


Abbildung 2. Einkristall-Röntgenstrukturanalyse des Difluortoluol-desoxynucleosids (rechts) und die bekannte Struktur von Thymidin (links).^[45, 46]

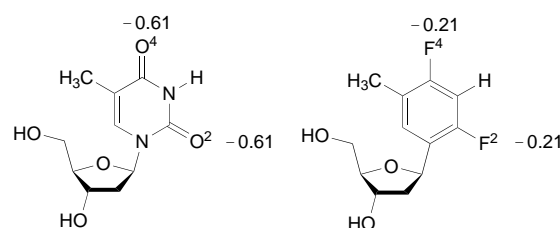
Relevanter für die biochemischen Aktivitäten sind die Strukturen dieser Analoga in Lösung, die auch in D₂O NMR-spektroskopisch untersucht worden sind. Dabei ergab sich, dass das Analogon dF eine Zuckerkonformation hat, die der von dT in Lösung weitgehend ähnelt; der Anteil an South-Konformer wurde bei dF zu 90–100 % und bei dT zu 70 % bestimmt.^[43] Beide Nucleobasen sind *anti*-orientiert, weisen also vom Zucker weg, wie dies bei den Nucleosiden in der DNA gewöhnlich der Fall ist. In Lösung sind die Zucker fast identisch (60 % South-Konformer bei dA und 70 % South-Konformer bei dZ) und die Basen sind beide *anti*-orientiert. In Lösung sind also beide Analoga in Bezug auf die sterischen und konformativen Verhältnisse nahezu perfekte Imitate der natürlichen Nucleoside.

2.2. Elektronische Faktoren

Es gibt in der Literatur einige Diskussionsbeiträge zu der Frage, ob Organofluorverbindungen Wasserstoffbrückenbindungen mit guten Donoren bilden können.^[47, 48] Im vorliegenden Fall ist diese Frage von besonderem Interesse, weil

zwischen Difluortoluol und Adenin zwei schwache Wasserstoffbrückenbindungen möglich scheinen. Eine davon wäre eine C–F...H–N-Wechselwirkung, die andere eine C–H...N-Wechselwirkung. Thalladi et al. zufolge sind jedoch Fluor-substituenten an sp²-hybridisierten Kohlenstoffatomen äußerst schlechte Acceptoren für Wasserstoffbrückenbindungen.^[49] Ähnliche Ergebnisse aus Untersuchungen mit Kronenethern lassen ebenfalls darauf schließen, dass solche Bindungen, falls sie tatsächlich existieren, sehr schwach sein müssen.^[50]

In einer Reihe rechnergestützter Studien wurden die elektronischen Eigenschaften der unpolaren Nucleosidanaloga untersucht, vor allem die von Difluortoluol.^[51–54] So ist beispielsweise in einigen Fällen die Partialladung am Fluor-substituenten F4 bestimmt worden; dieser entspricht dem O4-Atom in Thymin, also einer Gruppe, die an einer Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist. Die berechnete Partialladung an F4 ist –0.21, während sie an O4 –0.61 beträgt (Schema 3). Geht man von einfachen elektrostatischen Rechnungen mit punktförmigen Ladungen aus, würde



Schema 3. Berechnete Partialladungen bei Difluortoluol und Thymidin nach Wang und Houk.^[53]

man aufgrund der Enthalpieterme erwarten, dass die enthalpische Stabilität des F-A-Paares in der Gasphase etwa ein Drittel der des T-A-Paares beträgt. Ab-initio-Rechnungen der relativen F-A- und T-A-Paar-Stabilitäten liefern ähnliche Ergebnisse, sodass man eine recht schwache Paarung erwartet.^[52, 54] Außerdem wurde ausgeführt, dass die elektrostatischen Anziehungskräfte durch die hohe Dielektrizität von Wasser erheblich abgeschwächt würden.^[53] Aus den meisten theoretischen Untersuchungen wurde der Schluss gezogen, dass diese schwache nichtkovalente Wechselwirkung zwischen F und A nicht ausreicht, um die späteren Ergebnisse bei der DNA-Replikation zu erklären (siehe Abschnitt 5.3).

2.3. Bilden unpolare Nucleosid-Isostere Wasserstoffbrückenbindungen?

Trotz der oben angeführten Berechnungen bleibt die Frage, ob Analoga wie F Basenpaarungen eingehen können, interessant für weitere Experimente. Die Polaritäten von dT und dF wurden anhand der Verteilungsgleichgewichte zwischen Wasser und Octanol bestimmt (unveröffentlichte Ergebnisse). dT erwies sich als recht hydrophil und löste sich bevorzugt in Wasser statt in Octanol ($\lg P = -1.27$; P = Verteilungskoeffizient). Demgegenüber ist dF lipophil und löst sich im selben Maß bevorzugt in Octanol ($\lg P = 1.39$). Da der Zu-

ckerrest in beiden Verbindungen der gleiche ist, wird dadurch ein noch größerer Unterschied zwischen den Basen T und F verdeckelt. Wenn F also gut Wasserstoffbrückenbindungen eingehen könnte, würde man eine Bevorzugung der wässrigen Phase im Verteilungsgleichgewicht erwarten.

Eine direktere Untersuchung zur Frage der Wasserstoffbrückenbindungen wurde in Deuteriochloroform durchgeführt, indem alle Komplexe gemessen wurden, die sich aus 9-Ethyladenin und Difluortoluol (oder zum Vergleich einem Uracilderivat) bildeten.^[55] Die Komplexbildung wurde anhand der chemischen Verschiebungen von Adenin bei Zugabe von F oder U in steigender Konzentration gemessen. Dabei ergab sich, dass U tatsächlich zur Komplexbildung in der Lage ist, während sogar bei der größten untersuchten Konzentration von F keine Anzeichen auf eine Änderung der chemischen Verschiebungen festgestellt werden konnten. Wir finden also selbst in Chloroform, wo durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehaltene Komplexe viel stabiler sind als in Wasser, keine Hinweise auf Wasserstoffbrücken unter Beteiligung von F.

Ebenfalls von Bedeutung sind einige Befunde aus der NMR-spektroskopischen Untersuchung von DNA-Doppelhelices, die T oder F gepaart mit einem gegenüberliegenden A-Rest enthalten (siehe Abschnitt 3).^[56] Wir stellten fest, dass das H3-Proton von T im Duplex mit dem nativen Basenpaar um etwa 3.0 ppm zu tiefem Feld verschoben war, wenn sich ausgehend vom Einzelstrang der Duplex bildete. Diese Verschiebung wird dem Effekt der Wasserstoffbrückenbindung zwischen N1 und dem gegenüberliegenden Adeninrest zugeschrieben. Im Unterschied dazu beobachteten wir, dass H3 von F in der gleichen Situation sogar leicht (um 0.15 ppm) zu höherem Feld verschoben wird, wenn sich bei 3 °C der Duplex aus den Einzelsträngen bildet. Insgesamt lässt sich aus den NMR-spektroskopischen Daten kein Hinweis darauf ableiten, dass sich zwischen F und A Wasserstoffbrückenbindungen des Typs C–H...N oder F...H–N bilden.

3. Nachahmung der Sekundärstruktur

Der Befund, dass Analoga wie dF und dZ die Struktur der natürlichen Nucleoside in Lösung gut nachahmen, garantiert nicht, dass sie dies auch im Kontext doppelhelicaler DNA tun. Dies gilt vor allem im Licht von experimentellen Daten (die in Abschnitt 4.1 diskutiert werden), die zeigen, dass die Paarungseigenschaften der unpolaren und polaren Verbindungen in der DNA sehr unterschiedlich sind. Man könnte erwarten, dass eine Substitution, die die DNA stark destabilisiert (wie bei einigen F → T-Substitutionen), auch eine Strukturverzerrung verursacht. Wir untersuchten daher die Struktur eines kurzen DNA-Duplex, der Basenpaare mit F oder Z enthält.

Dies geschah mit 2D-NMR-Spektroskopie, kombiniert mit Messungen zur eingeschränkten Moleküldynamik und Energieminimierungsrechnungen.^[56] Der untersuchte Duplex bestand aus einer Sequenz von zwölf Basenpaaren, die der Bindungsstelle eines bekannten Transkriptionsfaktors entsprach. Die gewonnenen Daten zeigten überraschenderweise,

dass die Struktur dieses Duplex identisch ist mit derjenigen, die man bei einem Duplex mit einem A-T-Paar an der gleichen Stelle erwarten würde (Abbildung 3). Obwohl das F-A-Basenpaar also die DNA destabilisiert (siehe Abschnitt 4.1), nimmt es eine Anordnung ein, die sich von der eines T-A-Basenpaares nicht unterscheidet. Danach wurden Untersuchungen mit der gleichen Duplexsequenz durchgeführt, bei der sowohl T als auch A durch F und das Analogon Z ersetzt waren (unveröffentlichte Ergebnisse). Auch diese Untersuchungen lieferten nur Hinweise auf kleinere Verzerrungen der DNA-Struktur.

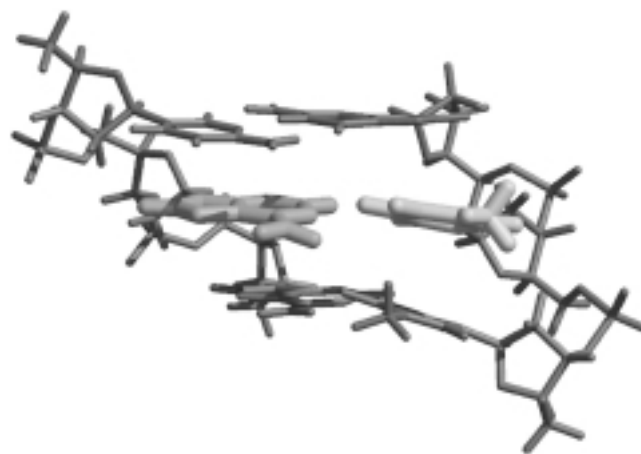


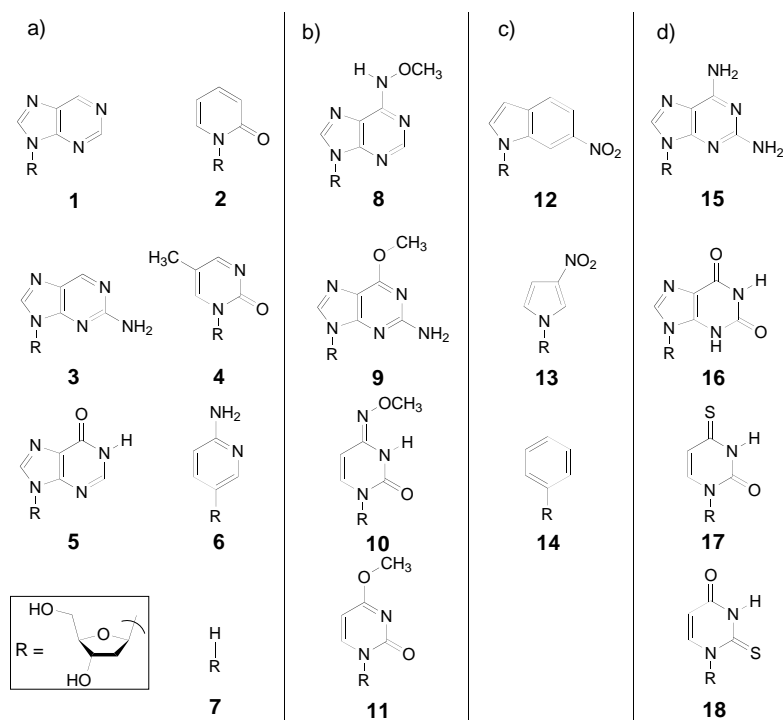
Abbildung 3. Seitenansicht der drei zentralen Basenpaare eines zwölf Basenpaare langen Duplex, der im Zentrum ein Adenin-Difluortoluol-Paar enthält. Das Analogon F befindet sich rechts.^[55]

4. Nichtkovalente Wechselwirkungen und Stabilität der DNA

4.1. Thermodynamische Konsequenzen der Entfernung von Wasserstoffbrückenbindungen

4.1.1. Nichtisostere Basenanaloga

Viele Analoga, in denen die wasserstoffbrückenbildenden Gruppen im Vergleich zu den natürlichen Basen entfernt, blockiert, modifiziert oder umgelagert sind, sind bereits untersucht worden.^[57–68] Einige dieser Verbindungen sind in Schema 4 gezeigt. Die Entfernung von Donor- oder Acceptorgruppen von Wasserstoffbrückenbindungen (Verbindungen **1–6**)^[57–60] oder die Entfernung der Base insgesamt (basenfreie Stelle, **7**)^[57] destabilisiert die DNA in unterschiedlichem Maß (Tabelle 1). Die einzige Ausnahme macht die Verbindung 2-Aminopurin **3**,^[61] mit der die Stabilität weitgehend erhalten bleibt; wahrscheinlich liegt dies daran, dass noch zwei Wasserstoffbrücken gebildet werden können, ohne dass die Watson-Crick-Geometrie gestört wird. Eine zweite Klasse von Analoga wurde hergestellt, bei denen die Donor- oder Acceptorgruppen blockiert sind (Verbindungen **8–11**);^[62–65] Beispiele sind die O-methylierten Derivate von Thymin und Guanin. Diese destabilisieren die DNA ebenso wie auch die Verbindungen der dritten Gruppe (**12–14**), in der Analoga ohne Ähnlichkeit mit den Purin- oder Pyrimidin-



Schema 4. Nucleosidanaloga, deren Wasserstoffbrückenbindungen bildende Gruppen entfernt (a) oder blockiert (b) wurden, sowie völlig andersartige (c) und modifizierte Analoga (d).

Tabelle 1. Schmelztemperaturen von DNA-Duplexen, die nichtisostere Basenanaloga enthalten.

Basenpaar X-Y	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
A-T ^[a,b]	42.5	–
A-C	36.0	6.5
A- ϕ	26.0	16.5
G- ϕ	30.0	12.5
C- ϕ	26.0	16.5
T- ϕ	28.0	14.5
A-B ^[a,b]	32.0	10.5
G-B	29.0	13.5
C-B	25.5	17.0
T-B	29.0	13.5
G-C ^[c,d]	45.4	–
O ⁶ meG-A	19.4	26.0
O ⁶ meG-G	22.6	22.8
O ⁶ meG-C	25.2	20.2
O ⁶ meG-T	21.9	23.5
A-T ^[e,f]	35.0	–
A-C	12.0	23.0
N-A	18.0	17.0
N-G	19.0	16.0
N-C	13.0	22.0
N-T	29.0	6.0

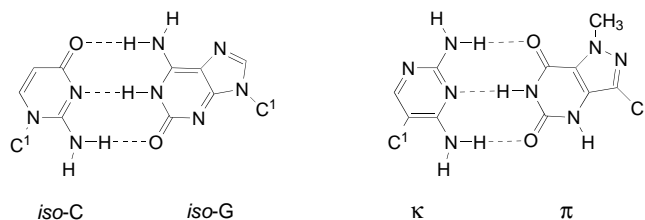
[a] Gemessen in der Sequenz d(AACCAGTACGXTGAG)·d(CTCAYCGTACTGGTT) in einem Puffer, der 9.5 mM NaCl, 2 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES) und 20 mM N,N,N',N'-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) enthielt (pH 7.0). B ist Verbindung **14**. [b] Daten von Millican et al.^[66] [c] Gemessen in der Sequenz d(GGTTXTTGG)·d(CCAAYAACC) in einem Puffer, der 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA und 10 mM Phosphat enthielt (pH 7.0). O⁶meG ist Verbindung **9**. [d] Daten von Gaffney und Jones.^[64] [e] Gemessen in der Sequenz d(CGGXGGC)·d(GCCYCCG) in einem Puffer, der 150 mM NaCl und 50 mM Phosphat enthielt (pH 7.0). N ist Verbindung **1**. [f] Daten von Eritja et al.^[57]

Basen zusammengefasst sind.^[66–68] Die Auswertung der Paarungsdaten der Verbindungen, die keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen mehr bilden können (Tabelle 1), ergibt, dass alle Analoga die DNA destabilisieren. Bei genauer Analyse lässt sich feststellen, dass der Stabilitätsverlust durch die vorgenommenen Substitutionen überraschend groß ist.

Ist diese Destabilisierung die Folge der fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen oder gibt es andere Faktoren, die die Stabilität der DNA beeinflussen? Zwei mögliche Erklärungen müssen in Betracht gezogen werden. Zum einen kann durch diese Analoga die Struktur nennenswert verzerrt werden, sodass nicht nur das betreffende Basenpaar, sondern auch die umgebende DNA beeinflusst wird. Diese Verzerrung kann daher rühren, dass sich die Analoga sterisch von den natürlichen Molekülen unterscheiden, was zu sterischen oder geometrischen Nachteilen führt. Zum anderen können aber auch Solvatationseffekte energetisch aufwändig sein. Dies wird in Abschnitt 4.3 diskutiert.

Bei einer anderen Klasse von Analoga ist die Fähigkeit modifiziert, Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden (Verbindungen **15–18**).^[58, 69] So wird eine Carbonylgruppe gegen eine Amino-Gruppe ausgetauscht, eine C=O-Bindung wird durch eine C=S-Bindung ersetzt oder eine Aminogruppe wird hinzugefügt. Einige dieser modifizierten Basen wie 2,6-Diaminopurin **15**^[69] oder 2-Thiothymidin **18**^[58] scheinen die DNA zu stabilisieren, da sie auch weiterhin die normalen Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen bilden und die korrekte Geometrie aufweisen, während andere leicht destabilisierend wirken.

Eine weitere Klasse von Analoga ist die mit anders angeordneten Wasserstoffbrückenbindungs-Donoren und -Acceptoren, die aufgrund dessen neue Basenpaare bilden. Es wurden zwei neue Watson-Crick-Basenpaare entworfen, die ein Wasserstoffbrückenbindungsmuster bilden, das sich von denen der Paare A-T und G-C unterscheidet (Schema 5). Diese Umordnungen beeinflussten die DNA-Stabilität nicht merklich.^[70, 71]



Schema 5. Strukturen neuer Basenpaare mit umgeordneten Wasserstoffbrückenbindungsmustern nach Benner et al.^[70, 90, 91]

4.1.2. Isostere unpolare Basenanaloga

Die unpolaren Nucleosid-Isostere verändern anders als die oben diskutierten Verbindungen nicht die sterische Größe der DNA-Base. Dadurch kann die Bedeutung der Wasserstoff-

brückenbindungen unabhängig von signifikanten sterischen Effekten untersucht werden. Die Ergebnisse von Untersuchungen zur Stabilität von DNA-Duplexen mit den Analoga F oder Z^[44, 55] sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2. Freie Energien und Schmelztemperaturen von DNA-Duplexen, die die isosteren unpolaren Basen F und Z enthalten.

Basenpaar X-Y ^[a]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	$-\Delta G_{25}^0$ [kcal mol ⁻¹]
T-A ^[b]	39.4	–	12.3
T-C	26.4	13.0	8.7
T-G	30.7	8.7	9.3
T-T	27.1	12.3	8.9
F-A ^[b]	21.4	18.0	7.4
F-C	25.0	14.4	8.2
F-G	23.0	16.4	8.0
F-T	20.3	19.1	7.3
F-F	28.6	10.8	8.9
A-T ^[c]	39.8	–	12.4
Z-A	25.3	14.5	8.0
Z-C	24.4	15.4	7.9
Z-G	23.8	16.0	7.6
Z-T	20.8	19.0	7.5
Z-F	30.3	9.5	8.9

[a] Gemessen in der Sequenz d(CTTTCXTTCTT)·d(AAGAAY-GAAAAG) in einem Puffer, der 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ und 10 mM Natrium-1,4-piperazinbis(ethansulfonat) (Na-PIPES) enthielt (pH 7.0). [b] Daten von Schweitzer und Kool.^[55] [c] Daten von Guckian et al.^[44]

Beide Analoga destabilisieren den DNA-Duplex stark. Einzelne Substitutionen mit F oder Z verringern die Stabilisierungsenergie um 4–5 kcal mol⁻¹, was ein signifikanter Anteil der gesamten Freien Energie des Duplex ist. Außerdem beobachteten wir, dass beide Analoga nahezu vollkommen unselektiv bei der Basenpaarung sind, wodurch sie den Duplex unabhängig von der natürlichen Base als Paarungspartner in jedem Fall etwa gleich stark destabilisieren. Dieses letzte Resultat legt nahe, dass die Wasserstoffbrückenbindungen eine wichtige Rolle bei der selektiven Basenpaarung der natürlichen Basen spielen. Thymin weist eine Selektivität von 3–4 kcal mol⁻¹ bei der Paarung mit A verglichen mit der Paarung mit T, C oder G auf, während das Molekül F, das die gleiche Größe und Form hat, nur wenig oder keine Selektivität zeigt. Dies spricht auch stark dafür, dass F in dieser Umgebung keinen messbar über Wasserstoffbrückenbindungen gebundenen Komplex mit A bilden kann.

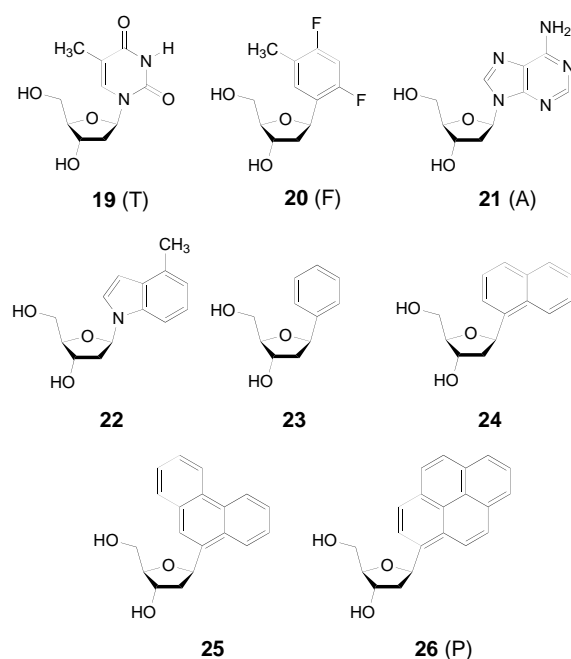
Bei genauerem Hinsehen werfen die Daten eine neue Frage auf: Wieso wirken diese Analoga so destabilisierend auf die Helix? Das einfache Entfernen des fraglichen Basenpaars hat eine geringere Destabilisierung zur Folge als beispielsweise das Paar F-A.^[72] Dies lässt vermuten, dass die Netto-Wechselwirkung zwischen F und A (oder T und Z) in Wasser tatsächlich um mehr als 2 kcal mol⁻¹ abstoßend ist. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass diese Analoga nur schwache Stapelwechselwirkungen eingehen; dies scheint allerdings nicht der Fall zu sein (siehe Abschnitt 4.2). Ein anderes Experiment zeigt, dass die Mutation eines F-A-Paares zu einem F-Z- oder F-F-Paar etwas weniger destabilisierend wirkt.^[44, 55] Ein Grund für den Energieaufwand bei der Paarung von F mit A ist also wahrscheinlich die Entfernung von fest gebundenen Wassermolekülen aus der

Solvathülle von A.^[73, 74] Den 2D-NMR-spektroskopischen Strukturdaten von F gegenüber von A in der DNA zufolge sind die beiden Basen im Zentrum des Duplex nahe beieinander angeordnet, was darauf hin deutet, dass etwa zwei solvatisierende Wassermoleküle bei der Duplexbildung ohne entsprechende energetische Kompensation abgespalten werden (denn F kann keine stabilen Wasserstoffbrückenbindungen mit A bilden). Ein anderer Faktor, der zur Destabilisierung beiträgt, ist das Fehlen von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen F und A. Ein dritter Punkt ist der, dass die größere Flexibilität der unpolaren Basenpaare (bedingt durch die fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen) möglicherweise die Stapelung benachbarter Basenpaare stört. Die oben diskutierten NMR-spektroskopischen Daten eines Duplex mit einem F-A-Paar zeigen, dass das Signal des benachbarten T-A-Basenpaars sich bei einer niedrigeren Temperatur verbreitert als das anderer Basenpaare der Sequenz, was auf eine größere Beweglichkeit des T-A-Basenpaares hindeutet.

4.2. Kräfte, die zur Aren-Stapelung in der DNA beitragen

Die Basenstapelung ist ein wesentlicher Faktor für die Stabilisierung der Doppelhelix, und das Phänomen ist bezüglich nichtkovalenter Bindungen noch relativ schlecht verstanden. Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Basenstapelung untersucht und mit den Ergebnissen eine Kontroverse ausgelöst.^[20–26, 75, 76] Manche gehen davon aus, dass elektrostatische Wechselwirkungen die primäre Triebkraft für die Basenstapelung sind, während andere die Bedeutung der hydrophoben Effekte betonen. Zwar war dieses Thema heftig umstritten, doch wurden nur wenige Untersuchungen zur Basenstapelung in der DNA selbst durchgeführt. Aus diesem Grund führten wir quantitative Experimente zur relativen Stapelfähigkeit natürlicher DNA-Basen und ihrer nichtnatürlichen Analoga in doppelsträngiger DNA durch.^[77] Die thermodynamischen Vergleiche wurden mit einem selbstkomplementären sechs Basenpaare langen Duplex mit der Sequenz 5'-dXCGCGCG in jedem Strang durchgeführt. Wenn der erwartete B-Duplex gebildet wird, bleibt X als überhängende Base, die mit den Basen der Helix Stapelwechselwirkungen eingehen kann, ungepaart. Ähnliche Untersuchungen sind bereits früher mit den natürlichen Basen in RNA durchgeführt worden.^[78] Dagegen gibt es (bis jetzt) nur ein publiziertes Beispiel für einen überhängenden Thymidinrest innerhalb einer DNA, für den die thermodynamischen Parameter vollständig bestimmt wurden,^[79] während in einer anderen Untersuchung lediglich die Schmelztemperaturen T_m für die vier natürlichen Basen veröffentlicht wurden.^[80] In keiner der vorangegangenen Arbeiten wurden nichtnatürliche Analoga untersucht.

Die Basen, die in unseren Experimenten untersucht wurden,^[77] sind in Schema 6 dargestellt und die zugehörigen Daten sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Von den natürlichen Basen geht A am stärksten Stapelwechselwirkungen ein; interessanterweise sind aber die Stapelwechselwirkungen der unpolaren Isostere F und Z stärker als die aller anderen natürlichen Basen. Dies steht in deutlichem Gegensatz zu der starken Destabilisierung, die von F und Z verursacht wird, wenn sie sich in der Mitte eines Duplex gegenüber von einer



Schema 6. Strukturen natürlicher und nichtnatürlicher Nucleoside, die auf ihre Neigung zur Basenstapelung hin untersucht wurden.^[77]

Tabelle 3. Freie Energien und Schmelztemperaturen von DNA-Duplexen, die eine überhängende, ungepaarte Base am 5'-Ende tragen.

ungepaarter Rest X ^[a,b]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	$-\Delta G_{37}^0$ [kcal mol ⁻¹] ^[c]
–	41.0	–	8.1
Thymin	48.1	7.1	9.2
Difluortoluol	54.4	13.4	10.7
Trimethylbenzol ^[d]	51.4	9.7	9.7
Cytosin	46.2	5.2	9.1
Adenin	51.6	10.6	10.1
Guanin	51.5	10.5	9.4
4-Methylindol	54.6	13.6	11.1
Pyrrol	46.6	4.9	8.9
Benzol	48.3	7.3	9.4
Naphtalin	56.2	15.2	10.9
Phenantren	57.3	16.3	10.7
Pyren	64.1	23.1	11.4

[a] Gemessen in der Sequenz d(XCGCGCG)·d(GCGCGCX) in einem Puffer, der 1 M NaCl und 10 mM Natriumphosphat enthält (pH 7.0). DNA-Konzentration: 5.0 μ M. [b] Daten von Guckian et al.^[77] [c] Die Werte wurden durch Auftragen von $1/T_m$ gegen $\ln(C_T)$ (C_T = Gesamtkonzentration) mit Daten aus mindestens fünf Konzentrationen bestimmt. [d] DNA-Konzentration: 6 μ M.

natürlichen Base befinden.^[44, 55] Mit Sicherheit ist der strukturelle Kontext wichtig, um diese Unterschiede zu erklären.

Zum Vergleich wurde eine einfache Serie unsubstituierter aromatischer Kohlenwasserstoffe untersucht; alle gingen relativ starke Stapelwechselwirkungen ein und mit zunehmender Größe nahm auch allgemein die Fähigkeit zur Stapelbildung zu. Die relative Fähigkeit zur Stapelbildung korreliert über die gesamte Serie von Molekülen nur wenig mit der Polarisierbarkeit oder der elektrostatischen Polarisierung. Stattdessen ist sehr wahrscheinlich der wichtigste Einzelfaktor in diesem Fall der hydrophobe Effekt, wobei die größten und am wenigsten polaren Moleküle die stärksten Stapelwechselwirkungen eingehen.

Aus diesen Daten ergeben sich einige nützliche Schlussfolgerungen und Anwendungen. Erstens scheint es, als ob natürliche DNA-Basen nicht sehr starke Stapelwechselwirkungen eingehen und dass es einfach ist, effizienter Stapelwechselwirkungen eingehende Verbindungen zu finden. Im Nachhinein erscheint dies vernünftig, denn die DNA-Helix muss an verschiedenen Stellen während der Genexpression und Replikation geöffnet werden. Zweitens sollten die relativ unpolaren Aminosäureseitenketten von Phenylalanin und Tryptophan ebenfalls gute Stapelwechselwirkungen mit DNA eingehen (siehe Tabelle 3, Daten zu den Phenyl- und Indolnucleosiden) und als solche gute Intercalatoren bei der Protein-DNA-Erkennung sein.^[81, 82] Drittens schließlich besteht eine nützliche und einfache Art, eine Nucleinsäurehelix zu stabilisieren, darin, eine leicht Stapelwechselwirkungen eingehende Gruppe ans Ende zu platzieren. So erhöht das Pyrennucleosid die Schmelztemperatur der Testsequenz um 23 Grad.

Durch starke Stapelwechselwirkungen können auch andere Strukturen als einfache Doppelhelices stabilisiert werden. Haarnadelschlaufen als Sekundärstrukturen enthalten Helixelemente und Schlaufen, die die Enden verbrücken. Die Reste in den Schlaufen sind oft gestapelt, auch wenn sie nicht nennenswert zu Basenpaarungen beitragen;^[83] so können durch die gesteigerte Fähigkeit zur Stapelbildung auch Schlaufenstrukturen stabilisiert werden. Dies wurde an Schlaufen nachgewiesen, die DNA-Doppelhelices verbrücken.^[84] In Tabelle 4 sind die Ergebnisse einer solchen Versuchsreihe aufgelistet. Pentanucleotid-Schlaufen wurden in eine Duplex-Sequenz eingebaut und untersucht, welche Auswirkungen es hat, wenn man die Nucleoside der Schlaufe durch unpolare Nucleoside ersetzt. In allen Fällen wurde die Stabilität der Strukturen durch den Austausch der Nucleoside erhöht.

Tabelle 4. Freie Energien und Schmelztemperaturen von DNA-Duplexen, die Tetranucleotid-Schlaufen enthalten.

DNA-Sequenz ^[a-c]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	$-\Delta G_{60}^0$ [kcal mol ⁻¹]
5' -GCAATTGA ^T T 3' -CGTTAACG ^T T	67.7	–	1.3
5' -GCAATTGA ^F F 3' -CGTTAACG ^F F	78.5	10.8	3.6
5' -GCAATTGA ^A A 3' -CGTTAACG ^A A	62.9	–	0.4
5' -GCAATTGA ^D D 3' -CGTTAACG ^D D	67.2	4.3	1.1

[a] Bedingungen: Puffer, der 100 mM NaCl und 10 mM Phosphat enthält (pH 7.0). DNA-Konzentration: 5.0 μ M. [b] D ist Verbindung **22**. [c] Daten von Ren et al.^[84]

4.3. Die Bedeutung von Solvatationseffekten bei der Paarung und Stapelung von Basen

Kleine unpolare Analoga wie F oder Z können also DNA-Strukturen stabilisieren oder destabilisieren, je nachdem, wo sie eingefügt wurden. Im Allgemeinen eignen sie sich gut als

Stapelwechselwirkungen eingehende Verbindungen, sind aber schlechte Paarungspartner. Interessanterweise gibt es allerdings eine Situation, in der Reste wie F oder Z *scheinbar* gut paaren. Wenn F sich z. B. gegenüber von A am Ende eines Duplex befindet, wirkt das entstehende Basenpaar stärker stabilisierend als ein natürliches T-A-Basenpaar (unveröffentlichte Ergebnisse). Wir führen diese Stabilisierung auf die stärkere Stapelwechselwirkung von F im Vergleich zu T zurück, wobei kein Energieverlust durch Desolvatation von A entsteht. Wir vermuten, dass Wasser am Ende der Helix an die polaren Gruppen von A gebunden bleibt.

Vermutlich werden eine Reihe von Effekten – starke Stapelung, schlechte Paarungseigenschaften im Zentrum der Helix, stabile Paarungen am Ende der Helix – durch Solvationseffekte in Wasser verursacht. Die guten Stapelungseigenschaften der unpolaren Verbindungen F und Z (und aromatischer Kohlenwasserstoffe) rühren von der günstigen Vermeidung lösungsmittel exponierter Oberflächen durch die Stapelstruktur her. Vermutlich nehmen leicht Stapelwechselwirkungen eingehende Reste diese Struktur bereits im Einzelstrang ein, wodurch die Entropieabnahme bei der Duplexbildung verringert würde. Es ist allgemein bekannt, dass eine Basenstapelung im Einzelstrang in nennenswertem Umfang zwischen Purinnucleotiden in der DNA stattfindet,^[85–87] und wir haben auch gesehen, dass unpolare Nucleoside sogar besser Stapelwechselwirkungen eingehen als die Purine.^[77] Wenn eine unpolare „Base“ in der Mitte eines Stranges liegt, kann sie ihre beiden flachen Oberflächen dem Lösungsmittel entziehen, indem sie mit beiden benachbarten Basen Stapelwechselwirkungen eingeht. Am Ende kann sie zumindest eine Oberfläche durch Stapelung vor dem Lösungsmittel verbergen.

An dieser Stelle erhebt sich eine interessante Frage: Wenn nur die flachen π -Oberflächen der unpolaren Analoga durch die Stapelung vom Lösungsmittel ausgeschlossen werden, warum gehen dann nicht auch die π -Oberflächen der natürlichen Basen mit gleicher Affinität Stapelwechselwirkungen ein? Haben nicht alle aromatischen π -Oberflächen die gleiche Fähigkeit zur Solvation und zum Stapeln? Sicher sind die Kanten der natürlichen Basen viel polarer als die der unpolaren Isostere, aber man kann doch davon ausgehen, dass die Kanten aller Basen in einsträngiger DNA dem Lösungsmittel ausgesetzt bleiben. Dies lässt vermuten, dass die flachen Oberflächen der aromatischen DNA-Basen polarer sind als die entsprechenden Oberflächen der unpolaren Isostere, und die Daten deuten auch darauf hin, dass die flachen Oberflächen der DNA-Basen besser solvatisiert werden können als die der sehr unpolaren Moleküle. Es sieht daher so aus, dass die Lösungsmittelmoleküle ihre Dipole so anordnen können, dass sie besser (oder weniger schlecht) mit den lokalen Bindungsdipolen wechselwirken können, die sich an den flachen π -Oberflächen der natürlichen Basen befinden. In den unpolaren Analoga sind diese Dipole allgemein klein oder sie fehlen.

Wie bereits erwähnt, verursachen fast alle unpolaren Nucleosid-Analoga im Inneren eines DNA-Duplex eine starke Destabilisierung, wenn sie mit einer natürlichen Base gepaart werden. Dies liegt sehr wahrscheinlich zum Teil an dem Energieaufwand für die Desolvatation der polaren

Kante der natürlichen Base,^[74] wenn die unpolare Base in der Helix in die Nähe dieser Kante gezwungen wird. Dieser Energieaufwand entsteht trotz der sehr starken Basenstapelung durch die unpolaren Moleküle, die offensichtlich nicht groß genug ist, um den Energieaufwand der Desolvatation zu kompensieren.

5. Überprüfung der DNA-Replikationsmechanismen

5.1. Frühere Untersuchungen

In dieser Arbeit sollten die genauen nichtkovalenten Wechselwirkungen, die die Bildung der Basenpaare steuern, untersucht werden. Im Mittelpunkt der oben beschriebenen Untersuchungen standen die inhärenten Eigenschaften der DNA-Basen und ihrer Analoga bei der Paarbildung. Den Ergebnissen mit den Analoga F und Z nach zu urteilen, scheinen die Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen einen nennenswerten Beitrag zur Stabilisierung der DNA-Doppelhelices zu leisten, und sie sind offenbar sehr wichtig für die Selektivität der Basenpaarbildung. Wegen des Fehlens von Gruppen, die Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können, sind F und Z 1) inhärent stark destabilisierend bei ihrer Wechselwirkung mit natürlichen Basen und 2) weisen sie – wenn überhaupt – eine nur sehr geringe Selektivität bei der Paarung auf.

Nachdem die inhärenten Eigenschaften der unpolaren Nucleosidmimetika einmal bestimmt waren, begannen wir, sie für eine Überprüfung der Mechanismen zu benutzen, nach denen der polymerasekatalysierte Einbau von Nucleotiden in die DNA abläuft. Als wir mit den Untersuchungen begannen, war die Überzeugung weit verbreitet, dass die Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen für die Replikation eines DNA-Basenpaares durch Polymerasen essentiell sind, und auch in neueren Ausgaben von Biochemie- und Molekularbiologie-Lehrbüchern wird argumentiert, dass die Wasserstoffbrückenbindungen allein die beobachtete Zuverlässigkeit der Reaktion erklären könnten.^[41, 42]

Wenn man die Daten sichtet, die bis 1995 mit modifizierten Nucleosiden gesammelt worden sind, findet man eine Reihe von Nucleosiden wie 6-O-Methylguanosin (O⁶meG, **9**) (Schema 4), das aus natürlichem Guanin durch Methylierung hergestellt wurde. Es blockiert die Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindung durch die Carbonylgruppe und macht aus dem Wasserstoffbrückenbindungs-Donor N1 einen Acceptor. Untersuchungen mit dem Klenow-Fragment der *E. coli*-DNA-Polymerase I, der vielleicht am meisten untersuchten DNA-Polymerase, ergaben, dass O⁶meG ein schlechtes Substrat ist.^[88] Wird es in einen DNA-Matrizenstrang eingefügt, baut das Enzym in der gegenüberliegenden Position Nucleotide mit einer Effizienz E (v_{\max}/K_m ; v_{\max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit, K_m = Michaelis-Konstante) ein, die 5000-mal niedriger ist als die Insertion von Cytidin gegenüber einem nichtmodifizierten Guanidinrest (Abbildung 4). Wenn Nucleotide eingebaut werden, besteht außerdem eine Tendenz, gleichermaßen C und T einzubauen.

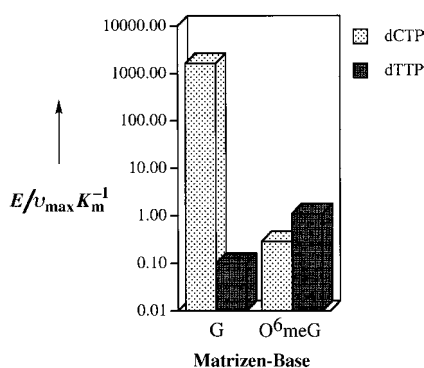
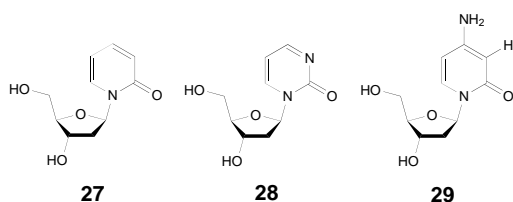


Abbildung 4. Histogramm, das den Einbau von dCTP und dTTP gegenüber von O⁶meG und zum Vergleich gegenüber von G im Gleichgewicht zeigt. Daten von Levy und Spratt.^[88]

Im Allgemeinen werden diese Änderungen der Eigenschaften von Verbindungen wie O⁶meG als Polymerasesubstrate der veränderten Wasserstoffbrückenbindungseigenschaften zugeschrieben. Da die Wasserstoffbrückenbindung zu Cytosin durch diese Modifikation blockiert wird, kann dies eine tragfähige Erklärung für solch ein Versuchsergebnis sein. Man muss allerdings auch andere Faktoren als mögliche Erklärungen in Betracht ziehen. Speziell die Größe und die Form des Moleküls werden durch die Substitution verändert; die Methylgruppe erhöht den Platzbedarf an der Position O6 um 2–3 Å, und der Verlust des Protons verringert den Platzbedarf an N1 um ca. 0,7 Å. Da sowohl Wasserstoffbrückenbindungen als auch sterische Verhältnisse betroffen sind, kann man sich nicht darauf verlassen, dass die Polymeraseaktivitäten gegenüber dieser Verbindung nur von einer der nichtkovalenten Wechselwirkungen bestimmt werden.

Eine vorangegangene Serie von Experimenten wurde durchgeführt, um die Bedeutung der Wasserstoffbrückenbindungen bei der DNA-Replikation aufzuklären.^[89] Dabei wurden neue Pyrimidinanaloga verwendet, denen eine einzelne Wasserstoffbrückenbindungen bildende Gruppe fehlte. Sie sind in Schema 7 gezeigt. Primer-Extension-Experimente



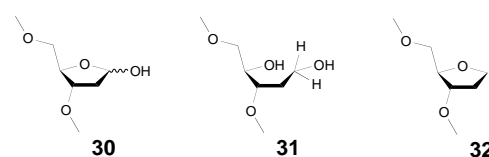
Schema 7. Desoxycytidanaloga, die von Strazewski und Tamm^[89] auf ihre Eignung als Polymerasesubstrate hin untersucht wurden.

wurden mit diesen Verbindungen sowohl im Matrizenstrang als auch als Nucleosidtriphosphate durchgeführt. Als Triphosphat war keine der Verbindungen in der Lage, den Primer zu verlängern. Im Matrizenstrang dagegen dirigierte Verbindung **29** (ein Analogon, das hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen beeinträchtigt ist) den Einbau von dCTP. Unglücklicherweise waren für diese interessanten Analoga keine quantitativen Daten verfügbar, sodass wir uns auf qualitative Befunde stützen müssen. Die allgemeine Schlussfolgerung aus dieser

Arbeit ist, dass der Hauptfaktor, der die Polymeraseaktivität bestimmt, die Zahl und Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen, zwischen den Basen eines Basenpaares ist.^[89] Wie bereits ausgeführt ist die Situation infolge der sterischen Änderungen an diesen Analoga allerdings etwas komplizierter. Und schließlich ermöglichen einige der vorgenommenen Änderungen eine Tautomerisierung der DNA-Base, was sowohl die Wasserstoffbrückenbindungen als auch die sterischen Effekte verwischt. Außerdem stellt sich bei der teilweisen Entfernung von Wasserstoffbrückenbindungen bildenden Gruppen auch die Frage nach Problemen im Zusammenhang mit der Solvation (siehe Abschnitt 4.3).

Weitere wichtige Untersuchungen wurden von Benner et al.^[70, 90, 91] durchgeführt, die Analoga nach einer anderen Strategie entworfen haben. Sie stellten Paare her, in denen die Wasserstoffbrückenbindungen nicht entfernt, sondern nur gegenüber den Paaren A-T und C-G umorientiert waren (Schema 5), wobei die Purin-Pyrimidin-Geometrie beibehalten wurde. Zwei solcher Basenpaare wurden (den qualitativen Ergebnissen nach) effizient durch die DNA-Polymerase (Klenow-Enzym) repliziert. Dies ist ein hübsches Beispiel dafür, dass vielleicht andere als die natürlichen Basenpaare benutzt werden können, um den genetischen Code zu erweitern. Diese Analoga bilden Wasserstoffbrückenbindungen und behalten die Watson-Crick-Geometrie bei; daher kann mit diesen Verbindungen die Bedeutung von Wasserstoffbrückenbindungen und geometrischen Effekten bei der Replikation nicht untersucht werden.

Ein anderes potentiell relevantes modifiziertes Nucleotid, mit dem die Rolle der Wasserstoffbrückenbindungen bei der DNA-Replikation untersucht werden kann, ist das abasische Nucleosid (Schema 8, **30**).^[92–94] Natürlicherweise vorkommende abasische Stellen sind eine der verbreitetsten Formen der DNA-Schädigung. Sie entstehen durch Schädigung der DNA-Basen durch Alkylierung und anschließende Hydrolyse der Glycosidbindung, durch Reparatur durch Ausschneiden der Base und durch spontanen hydrolytischen Verlust von Purinen.^[95–97]



Schema 8. Struktur der abasischen Stelle (**30**) und von Analoga der abasischen Stelle (**31**, **32**).

Abasische Stellen werden „nichtinstruktiv“ („non-instructional“) genannt, weil ihnen die Information aus den Wasserstoffbrückenbindungen fehlt.^[98, 99] Interessanterweise wird aber gegenüber von abasischen Stellen in einem Matrizenstrang von den meisten DNA-Polymerasen Desoxyadenosin eingebaut.^[94, 100–103] Diese Standardwahl durch das Enzym wird allgemein als „A-Regel“ bezeichnet. Die A-Regel wurde verschiedentlich durch eine dem Enzym inhärente bevorzugte Wechselwirkung mit A oder durch die niedrigere Polarität oder die besseren Stapel Eigenschaften von A im Vergleich zu den anderen Nucleotiden erklärt. Aus kinetischen Unter-

suchungen geht hervor, dass die Polymerasen dA gegenüber von abasischen Stellen mit einer Effizienz einbauen, die etwa um 3–4 Größenordnungen niedriger liegt als die beim Einbau gegenüber von T; man neigt daher dazu, den Wasserstoffbrückenbindungen einen signifikanten positiven Einfluss zuzuschreiben. Die abasische Stelle kann allerdings zu einer Verzerrung der DNA führen,^[104–107] was auch für die niedrige Effizienz verantwortlich sein kann. Von Interesse ist daneben die Größe der Selektivität für den Einbau von A gegenüber von abasischen Stellen. Die kinetischen Experimente zeigen, dass die Selektivität mit einer etwa 10-fachen Bevorzugung von dA gegenüber dG recht niedrig ist.^[92] Obwohl die abasischen Stellen interessante Informationen darüber liefern, was ohne Wasserstoffbrückenbindungen geschieht, machen es das Fehlen jeglicher Basenstruktur, mit dem sterische Effekte untersucht werden sollen, und die große Störung der Struktur durch das Fehlen der Base schwierig, die Einflüsse von sterischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zu bewerten.

In der allgemeinen Literatur über Polymerasemechanismen und die Zuverlässigkeit dieser Reaktion wird die Watson-Crick-Paarung meistens als wichtigster Faktor genannt, der den Einbau der Nucleotide vorantreibt und die Spezifität dieses Prozesses bestimmt.^[41, 42] Es ist allerdings bemerkenswert, dass einige Autoren auch die Relevanz betont haben, die der Erhaltung einer den Standardbasenpaaren ähnlichen Geometrie zukommt.^[108–110]

5.2. Vorhersagen des Wasserstoffbrückenbindungs-Modells

Bevor Experimente mit DNA-Polymerasen durchgeführt wurden, schauten wir uns an, welche Voraussagen sich aus dem Standardmodell ergeben würden. In einem nur auf Wasserstoffbrückenbindungen beruhenden Modell der Replikation wären Analoga wie F wahrscheinlich sehr schlechte Substrate für Polymerasen. Würde man ihren Umsatz als Substrat erzwingen, müsste man mit sehr geringer oder keiner Selektivität rechnen. Dies wäre nicht überraschend, denn F geht sehr instabile und unselektive Paarungen ein. Und tatsächlich werden solche thermodynamischen Basenpaarungsmessungen (in Abwesenheit von Enzymen) routinemäßig für die Vorhersage der Polymeraseaktivität mit dem gleichen Basenpaar durchgeführt.

5.3. Untersuchungen mit dem unpolaren Thyminanalogon F

Das Difluortoluol-Analogon wurde in synthetische DNA-Matrizen eingebaut und darauf getestet, ob es von einer DNA-Polymerase akzeptiert wird. Die ersten Versuche führten wir mit dem Klenow-Fragment der *E.-coli*-DNA-Polymerase I aus, die zu den am besten untersuchten DNA-Polymerasen gehört.^[34, 111–113] Dabei machten wir sofort eine Reihe überraschender Beobachtungen. In einem Experiment mit allen vier Nucleotiden verlief die Polymerasereaktion

über F hinaus ohne sichtbare Verzögerung fort und eines der natürlichen Nucleotide wurde direkt gegenüber von F eingebaut (Abbildung 5).^[114] Durch Zugabe nur einzelner Nucleotide wurde gezeigt, dass an dieser Stelle selektiv Adenin

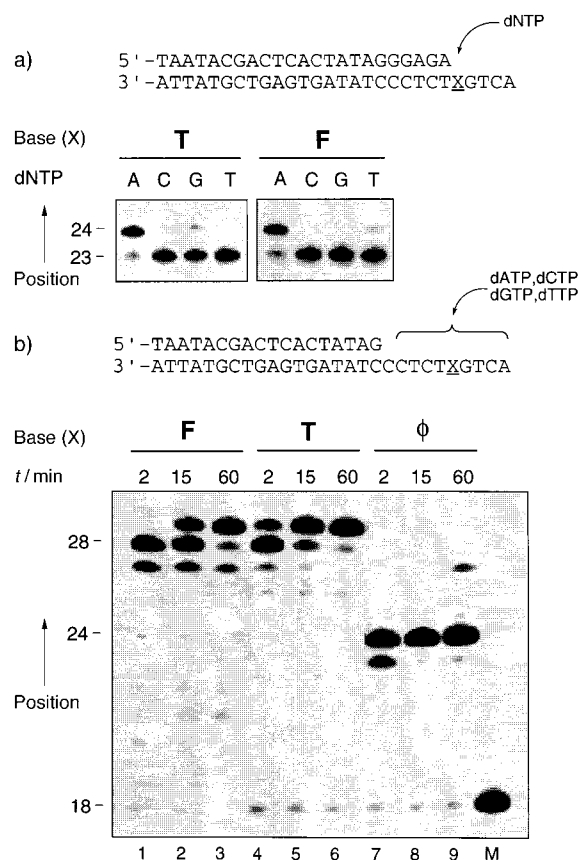


Abbildung 5. Polymerase-katalysierter Einbau von Nucleotiden gegenüber von Difluortoluol, Thymin oder einer abasischen Stelle. a) Autoradiogramm, das den Einbau eines einzelnen Nucleotids (aus den vier natürlichen Basen) in den 23/28 Nucleotide langen Primer-Matrizen-Duplex (d(TAATACGACTCACTATAGGGAGA)-d(ACTG $\underline{\text{X}}$ TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA)), der entweder Thymin oder Difluortoluol in Position X enthält.^[114] b) Autoradiogramm, das den Einbau mehrerer Nucleotide in den 18/28 Nucleotide langen Primer-Matrizen-Duplex (d(TAATACGACTCACTATAG)-d(ACTG $\underline{\text{X}}$ TCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA)) mit einer Mischung der vier natürlichen Nucleoside zeigt.^[114]

eingebaut wurde. Eine quantitative Steady-State-Kinetik-Analyse für das A-F-Paar ergab, dass die Effizienz der Synthese dieses Basenpaares nur etwa viermal niedriger war als bei einem natürlichen Basenpaar (Abbildung 6). Noch überraschender war, dass die Selektivität des Adenineinbaus (gegenüber der beim Einbau der anderen Nucleotide) beinahe so hoch war wie bei dem natürlichen Basenpaar. Da wir keine Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen bei F messen konnten, müssten neben den Wasserstoffbrückenbindungen noch andere Effekte wichtig für die Polymeraseaktivität sein. Sicherlich zwingt das Enzym dem Analogon F Eigenschaften auf, die dieses in Abwesenheit des Enzyms nicht aufweist. Damals schlugen wir vor, dass sterische Effekte ausreichen sollten, um die Ergebnisse zu erklären.^[114]

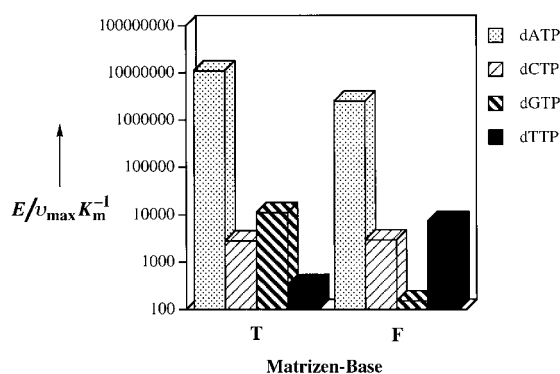


Abbildung 6. Histogramm zur Zuverlässigkeit des Nucleotideinbaus gegenüber von T und dem Isooster F in den Primer-Matrizenstrang, der in Abbildung 5 a^[114] dargestellt ist.

Wenn solch ein überraschendes Resultat auftaucht, muss man selbstverständlich auch nach anderen Erklärungsmöglichkeiten suchen. Man könnte z. B. den Schluss ziehen, dass F als schlechter Wasserstoffbrückenbildner hauptsächlich als nichtinstruktive Base wirkt und das Enzym beim selektiven Einfügen von A einfach der A-Regel folgt. Wir wiesen allerdings darauf hin, dass das A-F-Paar deutlich effizienter prozessiert wird, als es nach der A-Regel geschieht, und dass es keine größeren Pausen verursacht wie A gegenüber einer abasischen Stelle.^[114] Nichtsdestoweniger besteht die beste Methode, die A-Regel-Hypothese zu widerlegen, darin, das Basenpaar umzudrehen. Wir synthetisierten daher das Nucleosidtriphosphat-Derivat von F und verfolgten seinen Einbau durch die Polymerase.^[115] Der Einbau war noch immer hoch effizient und die Selektivität war so hoch wie beim natürlichen Basenpaar (Abbildung 7). Wir schlossen daraus, dass die A-Regel hier nicht angewendet werden kann. Demnach ist die Wasserstoffbrückenbindung bei der DNA-Synthese nicht so wichtig wie allgemein angenommen; vielleicht spielen sterische Effekte eine signifikante Rolle.

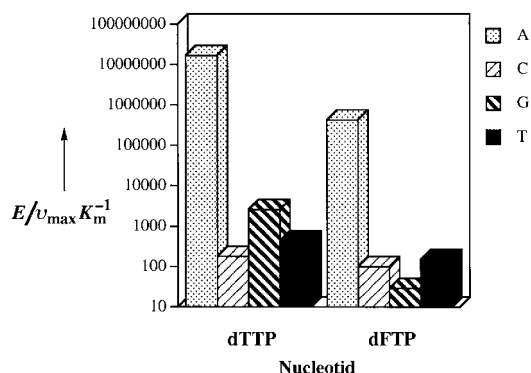


Abbildung 7. Histogramm zur Selektivität des Einbaus von dTTP und dFTP gegenüber von den vier natürlichen Basen in den Primer-Matrizenstrang, der in Abbildung 5 a^[115] dargestellt ist.

Später wurde gezeigt, dass das F-A-Basenpaar jedes T-A-Paar in einem 48 Basenpaare langen Duplex ersetzen kann und dass in sechs unterschiedlichen DNA-Umgebungen eine zuverlässige Synthese abläuft.^[116] Ironischerweise war die synthetisierte DNA deutlich weniger stabil als die natürliche

DNA. Es ist jedoch klar, dass die DNA-Polymerase die Destabilisierung nicht registriert, bis der Übergangszustand des Nucleotideinbaus weiterreagiert hat. Sie tut dies aber offenbar dann, wenn mehrere F-A-Paare nacheinander synthetisiert werden.^[116] Nach unserer Auffassung rührt dies von der erzwungenen Desolvatation der F-A-Paare her, wenn sie tiefer in das aktive Zentrum des Enzyms eingelagert werden.

In späteren Untersuchungen wurden auch verschiedene Polymerasen auf ihre Fähigkeit getestet, das F-A-Paar zu prozessieren (unveröffentlichte Ergebnisse). Wir fanden heraus, dass die *Taq*-Polymerase, die T7-DNA-Polymerase und die reverse Transkriptase aus HIV das Paar qualitativ betrachtet sehr gut umsetzen können. Quantitative Daten sind noch nicht verfügbar.

5.4. Untersuchungen mit dem unpolaren Adeninanalogon Z

Die Ergebnisse mit dem Analogon F warfen Fragen über die Allgemeingültigkeit und den Mechanismus auf. Würden mit anderen Nucleosid-Isoosteren ähnliche Ergebnisse gefunden werden? Oder sind die Fluorsubstituenten verantwortlich für die spezielle Aktivität von F? Eine mögliche Erklärung für die hohe Effizienz des F-A-Basenpaares bei der Replikation ist, dass F ein durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehaltenes Paar mit A bildet. Außerdem könnte ein anderer möglicher Einfluss auf die Selektivität des F-A-Paares von Solvationseffekten herrühren: Da A die am wenigsten stark solvatisierte von allen natürlichen Basen ist, würde dies eine Paarung mit einem unpolaren Analogon wie F begünstigen.

Daher führten wir eine Reihe von Replikationsversuchen mit dem neuen Analogon Z (Schema 1) durch, das eine 4-Methylbenzimidazolgruppe anstelle von Adenin in dA trägt.^[44] Modellvorstellungen zufolge sollte Z gegenüber von F in ein DNA-Duplex passen und dabei nur eine geringe Strukturverzerrung durch den Raumbedarf des H1-Protons (einer Gruppe, die in A fehlt) verursachen. Qualitative und quantitative Experimente wurden mit dem Klenow-Fragment durchgeführt. In Übereinstimmung mit den früheren Resultaten mit dem Analogon F beobachteten wir eine recht effiziente Basenpaar-Synthese, wenn Z in den Matrizenstrang eingebaut war oder als Desoxynucleosidtriphosphat verfügbar war (Abbildung 8, 9). Außerdem werden F und Z, wenn sie einander gegenüber liegen, trotz des unbestreitbaren Fehlens von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen gut repliziert. Interessant ist auch, dass Z gegenüber von einem anderen Z-Rest nicht so gut eingebaut wird. Damit hat man hier ein Beispiel für Selektivität ohne Wasserstoffbrückenbindungen. So schlossen wir, dass eine effiziente Synthese von Basenpaaren durch diese Polymerase nicht von den Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen abhängt.^[117] Auch sterische Effekte allein (ebenfalls ohne Wasserstoffbrückenbindungen) können zu einer signifikanten Paarungsselektivität führen. Wichtig ist, dass die beobachtete Selektivität bei den Analoga F und Z bei Verwendung des Klenow-Fragments viel höher ist als die sehr niedrige oder fehlende Paarungsselektivität ohne Enzym.^[44] Es scheint also, dass das

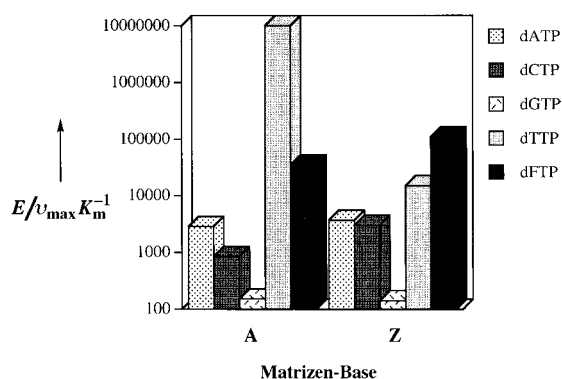


Abbildung 8. Histogramm zur Zuverlässigkeit des Nucleotideinbaus gegenüber von A und dem Isooster Z in den Primer-Matrizenstrang, der in Abbildung 5a^[117] dargestellt ist.

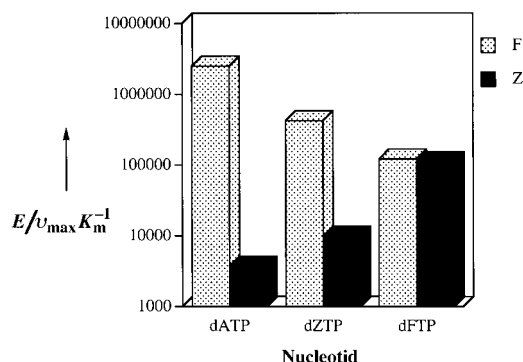


Abbildung 9. Histogramm zur Zuverlässigkeit des Nucleotideinbaus gegenüber von den Isosteren Z und F in den Primer-Matrizenstrang, der in Abbildung 5a^[117] dargestellt ist.

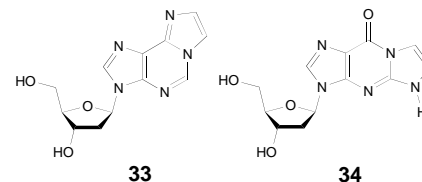
Enzym ein aktives Zentrum aufweist, dessen Geometrie sich stark nach der Watson-Crick-Duplex-DNA richtet und das die Flexibilität von DNA-Rückgrat und Basen stark einschränkt.

Nach unseren Untersuchungen mit den Analoga F und Z unterscheiden sich die beiden Glieder des Paares in einer Hinsicht stark von den natürlichen Basen T und A: Uns fiel auf, dass dFTP auch gegenüber einem anderen F-Rest im Matrizenstrang recht effizient eingebaut wird (Abbildung 9).^[115, 117] Demgegenüber wird das analoge natürliche Paar T-T 900-mal weniger gut vom Klenow-Fragment synthetisiert. Mögliche Gründe für diesen Unterschied werden in Abschnitt 5.7 diskutiert.

5.5. Andere in ihrer Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen beeinträchtigte Nucleotide

Die Aktivität von DNA-Polymerasen bei der Umsetzung anderer in ihrer Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen beeinträchtigter Nucleotide ist kürzlich in einem Übersichtsartikel dargestellt worden,^[118] weshalb wir die Daten hier nur kurz diskutieren werden. Vor den Arbeiten mit Difluortoluol- und Benzimidazolanaloga wurden keine Polymeraseuntersuchungen mit Nucleotidanaloga durchgeführt, denen die Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen vollständig fehlte. Die Ethenoadenin- und Ethenoguanindesoxynucleosid-Addukte **33** bzw. **34** sind von

möglichem Interesse (Schema 9), aber εG **34** kann potentiell noch immer eine Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindung bilden,^[119] und εA kann wasserstoffbrückengebundene Komplexe bilden, indem es eine *syn*-Glycosid-Orientierung einnimmt.^[120] Letztendlich stammen die einzigen überzeugenden Ergebnisse für den Fall ohne Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen aus der vorher erwähnten Arbeit mit



Schema 9. Strukturen von 1,6-*N*-Ethenodesoxyadenosin **33** und 1,2-*N*-Ethenoguanin **34**, die bei der Alkylierung von dA und dG mit Vinylchlorid entstehen.

abasischen Stellen in der DNA^[92–94] und den beschriebenen unpolaren Analoga. Interessanterweise gibt es eine Arbeit aus dem Jahr 1973, in der die Untersuchung von Benzimidazoldesoxynucleosid, das innerhalb von Zellen in die DNA eingebaut wurde, beschrieben ist.^[121] Es wurden keine Untersuchungen mit einer gereinigten Polymerase oder mit einer isolierten DNA-Sequenz durchgeführt, weshalb für dieses Analogon keine quantitativen Daten verfügbar sind. In einer anderen interessanten Arbeit aus dem Jahr 1984 wird der Einbau von Benzoldesoxynucleosid in synthetische DNA beschrieben.^[66] Mit Polymerasen wurden keine Untersuchungen durchgeführt. Die Autoren berichteten aber, dass das Analogon sehr instabile Paare mit natürlichen Basen bildete, schrieben dies allerdings den schlechten Basenstapeleigenschaften zu; wie wir heute wissen, ist diese Erklärung unzutreffend.^[77]

5.6. Diskussion möglicher Erklärungen

Die Arbeit mit den Analoga dF und dZ wirft eine wichtige und provokante Frage auf: Stimmt es, dass die Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen für eine effiziente und spezifische Replikation der DNA-Basenpaare vollkommen entbehrlich sind? Bevor dieser Schluss mit hinreichender Sicherheit gezogen werden kann, müssen wir alternative Erklärungen prüfen, die mit unseren Ergebnissen übereinstimmen. Eine mögliche Erklärung, die es zu betrachten gilt, ist, dass das Analogon F korrekt funktioniert, weil es in Wirklichkeit doch effiziente Wasserstoffbrückenbindungen mit A eingeht.^[51] Es scheint allerdings klar zu sein, dass dies nicht der Fall ist: 1) Wir finden keinen messbaren Komplex zwischen Difluortoluol und Adenin, nicht einmal in einem Lösungsmittel, das eine solche Bindung stark begünstigt.^[55] 2) dF ist äußerst hydrophob, während dT deutlich hydrophil ist. 3) F zeigt keine Tendenz, mit A eine Paarung einzugehen, nicht einmal, wenn beide in gegenüberliegende Positionen einer DNA-Helix gezwungen werden. 4) F weist bei der Paarung mit A keine messbare Selektivität auf, Thymin dagegen eine Selektivität von 3–4 kcal mol⁻¹ in der gleichen DNA-Umge-

bung. 5) Obwohl Rechnungen auf eine geschwächte Wasserstoffbrückenbindung zwischen F und A in der Gasphase hindeuten,^[52, 54] scheinen sich die meisten Theoretiker dahingehend einig zu sein, dass es in Wasser bei weitem nicht genügend günstige Wechselwirkungen gibt, um mit unseren Ergebnissen übereinzustimmen.^[52–54, 122] 6) Wasserstoffbrückenbindungen lassen sich in Fällen wie dem Paar F und Z, das immer noch relativ effizient vom Enzym gebildet wird, sicher ausschließen.

Eine zweite Erklärung, warum gegenüber von F bevorzugt Adenin eingebaut wird, geht von der gegenteiligen Annahme aus, dass F unpolar ist und keine Wasserstoffbrückenbindungen eingeht. Man könnte argumentieren, dass F eine andere nichtinstruktive Läsion der DNA ist, analog zu abasischen Stellen. Doch auch das scheint durch die Experimente nicht belegbar zu sein. Zum einen beobachtet man eine lange Pause, wenn A gegenüber von abasischen Stellen inseriert wird, während keine solche Pause auftritt, wenn A gegenüber von F eingebaut wird.^[114] Zum anderen ist die Insertion von A gegenüber von F um zwei Größenordnungen effizienter als die Insertion gegenüber von abasischen Stellen und die Spezifität des Einbaus gegenüber von F ist um zwei Größenordnungen höher. In dieser Hinsicht verhält sich F eindeutig nicht wie die anderen nichtinstruktiven DNA-Läsionen. Das wahrscheinlich überzeugendste Ergebnis erhält man allerdings, wenn das F-A-Paar umgedreht wird.^[115] Aus den vorliegenden Daten ergibt sich, dass F sehr gut gegenüber von A eingebaut werden kann, und auch hier erfolgt der Einbau mit hoher Spezifität. In diesem Fall wird kein Adenin eingebaut, sodass die A-Regel nicht herangezogen werden kann. Aus diesen Gründen ist auch die zweite Erklärung nicht schlüssig.

Die letzte alternative Erklärung, die es zu betrachten gilt, ist, dass Solvationseffekte die enzymatische Paarbildung zwischen F und A (in beiden Richtungen) begünstigen könnten. Tatsächlich scheint Rechnungen zufolge die Watson-Crick-Kante von Adenin weniger stark solvatisiert zu sein als analoge Teile anderer DNA-Basen.^[74] Aus diesem Grund könnte weniger Energie notwendig sein, um F mit A enzymatisch zu paaren als F mit T, C oder G. Wenn diese Erklärung korrekt wäre, warum kommt es dann aber nicht auch in Abwesenheit von Enzymen zur selektiven Paarung zwischen F und A? Außerdem baut die Polymerase bei der Untersuchung des Analogons Z im Matrizenstrang selektiv T ein,^[117] obwohl diese Base zu den am stärksten solvatisierten der vier Basen gehört.^[74] Daraus folgt, dass die meisten verfügbaren Daten diesen Solvationseffekt als die wichtigste Komponente anstelle der sterischen Effekte nicht stützen. In jedem Fall ist wahrscheinlich der beste Weg, solche Effekte auszuschließen, Paare zu suchen, bei denen keiner der Partner stark solvatisierte Wasserstoffbrückenbindungen bildende Gruppen trägt. Unseren Versuchen zufolge wird das Paar F und Z tatsächlich mit guter Effizienz und mit nennenswerter Selektivität gebildet (die Ergebnisse wurden in Abschnitt 5.4 diskutiert).

Daher fühlen wir uns insgesamt recht sicher bei der Feststellung, dass Wasserstoffbrückenbindungen nicht notwendig sind, um eine hocheffiziente Synthese von Basenpaaren sicherzustellen, und dass ein nennenswertes Maß an

Selektivität auch bei vollständigem Fehlen solcher Bindungen erreicht werden kann. Es ist aber wichtig festzuhalten, dass die Replikation von Z als Gegenstück zu F nicht ganz so effektiv verläuft wie die eines natürlichen Basenpaares und dass der fehlerhafte Einbau von Z gegenüber von Z stärker begünstigt ist als der analoge Fehler A gegenüber von A.^[117] Daher lässt sich ein kleinerer günstiger Einfluss der Wasserstoffbrückenbindungen auf die Effizienz und vor allem die Spezifität nicht ausschließen.

5.7. Das Modell des sterischen Ausschlusses für die DNA-Replikation

Die in Abschnitt 5.6 beschriebenen Ergebnisse veranlassen uns, ein Modell für die Replikation von DNA-Basenpaaren vorzuschlagen, das nicht von den Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen zur Erklärung von Effizienz und Selektivität abhängt. Nach dem sterischen Ausschlussmodell^[118] ist das aktive Zentrum der Polymerase relativ starr und weist eine Bindungstasche von spezifischer Größe und Form auf. Diese Tasche im aktiven Zentrum hat vier mögliche Formen, da sie durch die Struktur der Polymerase und der Matrizenbase unmittelbar unterhalb des Primers (downstream) definiert wird. Das neu hinzukommende Nucleotid wird durch die Bindung des Triphosphatrestes und durch die exakte Passform der DNA-Base in geeigneter Position für die Polymerisation (Bildung der Phosphodiesterbindung) fixiert. Die Kräfte, die die Bindung des Nucleosidtriphosphates im Übergangszustand unterstützen, sind die Bindung von Triphosphat und Zucker und die Stapelung der Base mit der Base am 3'-Ende des Primers. In dem einfachen sterischen Ausschlussmodell tragen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Basen nicht viel zur Stabilisierungsenergie des Übergangszustandes bei. Das liegt daran, dass sowohl die Matrizenbase als auch die neue Nucleotidbase bereits vor der Reaktion Wasserstoffbrückenbindungen zu Wassermolekülen gebildet haben, sodass wenig Stabilisierungsenergie dadurch gewonnen werden kann, dass diese gegen Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen ausgetauscht werden.

Wie wird nun die Zuverlässigkeit der DNA-Synthese nach dem sterischen Ausschlussmodell erklärt – also die hohe Selektivität bei der Auswahl des korrekten Nucleotids für den Einbau in die DNA anstelle der anderen drei? Auch wenn das Modell nicht ausschließt, dass auch andere Faktoren wie Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen zusätzliche Beiträge leisten, lohnt es sich zu überlegen, wie sterische Effekte allein eine hohe Selektivität sichern können. Es ist klar, dass die Annahme eines starren aktiven Zentrums, das eine genaue Passform der Duplex-DNA bildet,^[39, 123–131] gleichzeitig eine Erklärung dafür liefert, warum Purine nicht fälschlicherweise gegenüber von Purinen eingebaut werden: Sie sind schlicht zu groß, um gemeinsam in das aktive Zentrum zu passen (Abbildung 10). Außerdem kann man das Argument des sterischen Ausschlusses heranziehen, um zu erklären, warum Purin-Pyrimidin-Fehlpaarungen (G-T und A-C) nicht leicht synthetisiert werden. Wenn man versucht, ihnen eine Standard-Basenpaargeometrie aufzuzwingen, kommt es zur

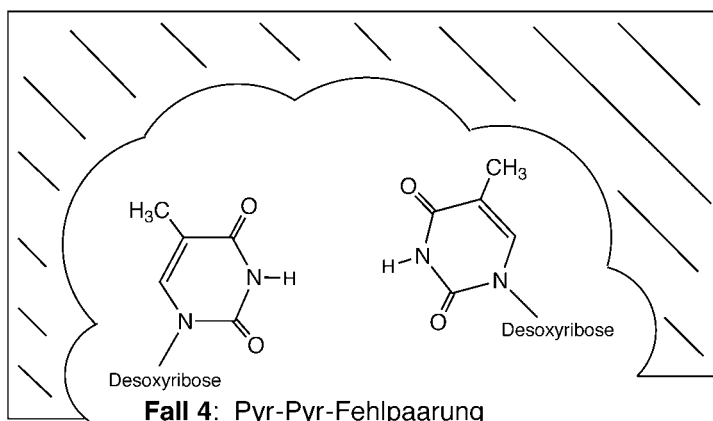
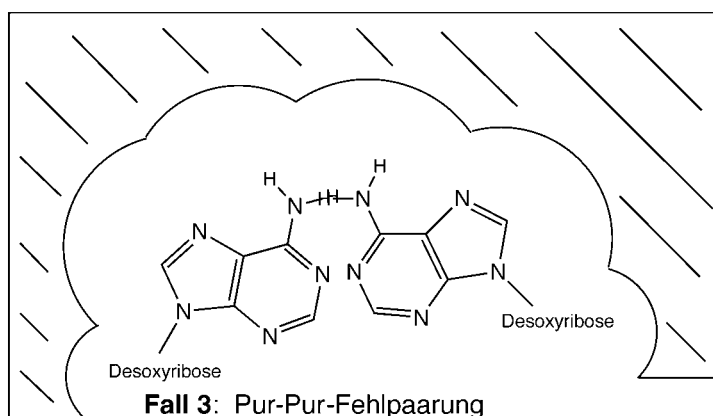
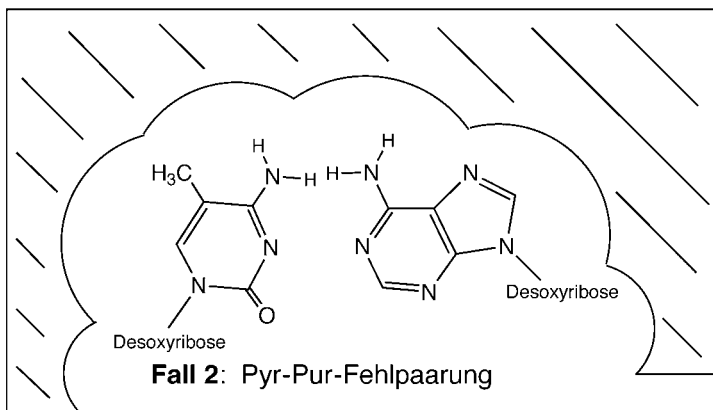
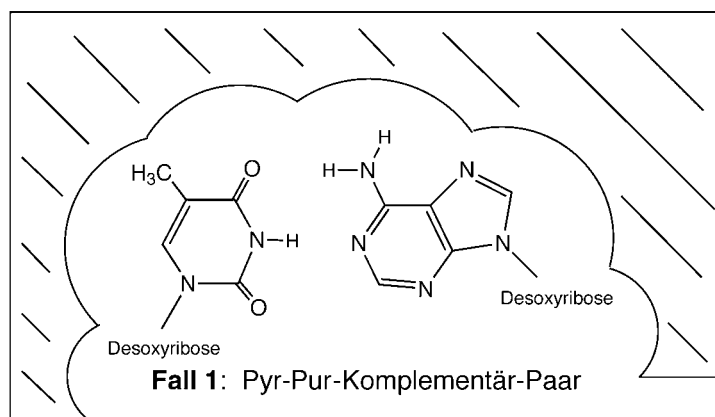


Abbildung 10. Darstellung sterischer Kollisionen, die Fehlpaarungen im aktiven Zentrum der Polymerase in mindestens drei von vier Kombinationsmöglichkeiten ausschließen könnten. Die DNA-bindende Spalte in der Polymerase umfasst die Matrize sehr eng und lässt im aktiven Zentrum nur eine Aussparung für das Triphosphat, die durch die Polymerase und die Matrizenbase bestimmt wird.

sterischen Überlappung von zwei Protonen in jedem der beiden Paare. Wird außerdem noch eine *wobble*-Geometrie eingenommen, kommt es im aktiven Zentrum wiederum zu einer sterischen Kollision zwischen dem Protein und dem Basenpaar. Für diese Art von Fehlpaarungen wird ein einfaches sterisches Schlussargument den Daten gut gerecht.

An einer Stelle scheint dieses einfache Modell allerdings zu kurz zu greifen: Wie lässt sich erklären, warum die sterisch kleinen Pyrimidine nicht gegenüber von anderen Pyrimidinen falsch eingebaut werden? Sicherlich bedarf die geringe Häufigkeit solcher Fehlpaarungen^[132] einer Erklärung und sterische Effekte, wie sie zu Beginn dieses Abschnitts beschrieben wurden, wären dafür nicht tragfähig, denn zwei Pyrimidinreste können leicht in den Raum eingepasst werden, der normalerweise von einem Pyrimidin-Purin-Paar eingenommen wird. Vermutlich muss man die eng gebundenen Lösungsmittelmoleküle mit in Betracht ziehen, die fest mit den polaren Gruppen der DNA-Basen assoziiert sind. Jede dieser Gruppen ist über Wasserstoffbrückenbindungen mit mindestens einem Wassermolekül verbunden. Eine solche Wasserstoffbrückenbindung hat eine Stärke von 6–7 kcal mol⁻¹ (Gasphasenenthalpie).^[18, 19] Zwar tauscht ein solches Wassermolekül mit anderen in Lösung schnell aus, geht aber wegen des Energieaufwandes für den Bindungsbruch nahezu nie verloren. Letztendlich wird ein solvatisierendes Wassermolekül in wässriger Lösung nur dann freigesetzt, wenn es unter Bildung einer anderen komplementären, energetisch gleichwertigen Wasserstoffbrückenbindung ausgetauscht wird.

Wir sind der Auffassung, dass die fest gebundenen Wassermoleküle aus der Solvathülle entlang der Watson-Crick-Paarungskante einer natürlichen DNA-Base dazu dienen, die Base sterisch größer zu machen als wir sie im Allgemeinen zeichnen (Abbildung 11). Daher sind Pyrimidine (genau genommen alle Basen) größer als wir sie uns üblicherweise vorstellen, und dieser zusätzliche sterische Anspruch kann wichtige energetische Einflüsse auf den Übergangszustand der DNA-Polymerisation haben. Daher glauben wir, dass Pyrimidine gegenüber von Pyrimidinresten nicht falsch eingebaut werden, weil sie zu groß sind. Sie werden die Wassermoleküle nicht abgeben (sodass die klein genug wären, um zu passen), weil sie sie nicht unter Bildung energetisch gleichwertiger Wasserstoffbrückenbindungen austauschen können.

Gibt es für den sterischen Effekt des Wassers in der Hydrathülle experimentelle Befunde? Wir beschreiben hier die Ergebnisse zweier experimenteller Untersuchungen, einer mit Polymerasen sowie einer anderen mit kleinen Molekülen. Als erstes betrachten wir die klassische Messung der sterischen Größe einer funktionellen Gruppe in der Organischen Chemie: die Größe *A*, die für substituierte Cyclohexane gemessen wird. *A* repräsentiert das Ausmaß der sterischen

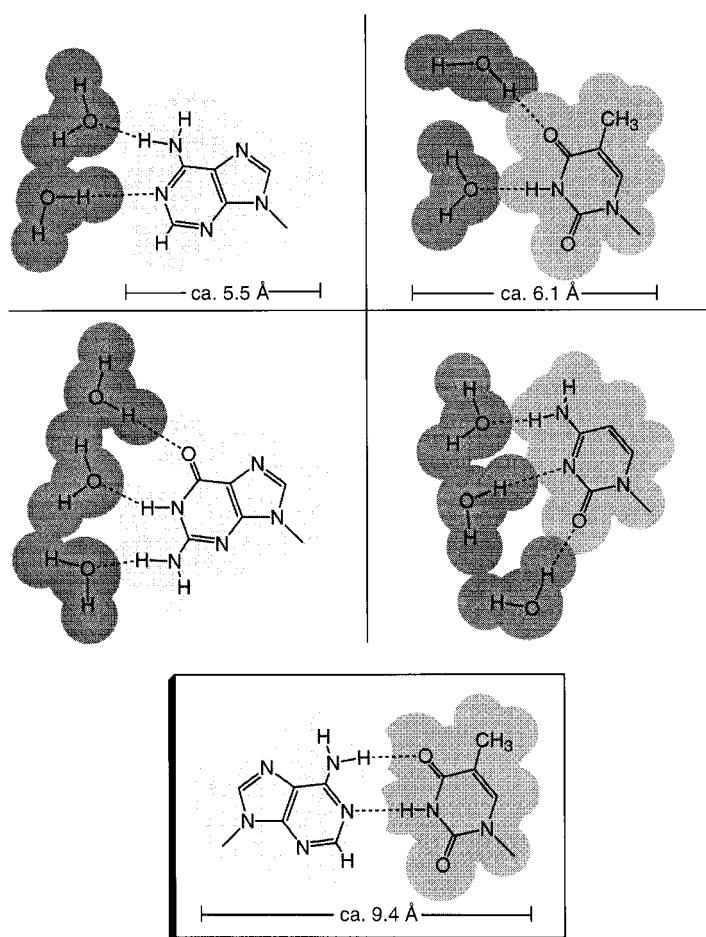


Abbildung 11. Schematische Darstellung möglicher Geometrien solvatisierender Wassermoleküle an den vier DNA-Basen. Darüber hinaus ist die abgeschätzte Größe der van-der-Waals-Oberfläche einer solvatisierten Pyrimidin- und Purinbase dargestellt, woran deutlich wird, wie stark die DNA-Basen durch die Solvation in Wasser vergrößert werden. Eine solvatisierte Pyrimidinbase kann zwei Drittel der Größe eines ganzen Basenpaares ausmachen!

Kollisionen mit axialen Protonen, und es wurde vor einiger Zeit erkannt, dass sich für polare Gruppen in protischen Lösungsmitteln größere Werte ergeben als in aprotischen.^[133] So hat die Hydroxygruppe von Cyclohexanol einen *A*-Wert von 0.52 in einem aprotischen und von 0.87 in einem protischen Lösungsmittel. Ein ähnlicher Trend lässt sich für die Aminogruppe von Cyclohexamin aufzeigen, die einen *A*-Wert von 1.2 in einem aprotischen und von 1.6 in einem protischen Lösungsmittel hat.

In der zweiten Untersuchung mit unseren unpolaren Isosteren wurden Hinweise erhalten, die den Einfluss des solvatisierenden Wassers auf die sterische Größe der DNA-Basen stützen. Wie bereits erwähnt beobachten wir, dass Difluortoluol gegenüber von einem weiteren Difluortoluolrest 900-mal besser eingebaut wird als T gegenüber von einem weiteren T-Rest.^[115] Wir führen die einfache Synthese des Basenpaares F → F auf die Tatsache zurück, dass F klein genug ist, um gegenüber von einem weiteren F-Rest eingefügt zu werden. Im Unterschied dazu ist T mit seiner Hydrathülle zu groß, um gegenüber von einem anderen T-Rest (der ebenfalls solvatisiert ist) eingepasst zu werden.

Die „Puzzle-Vorhersage“

Das sterische Ausschlussmodell für die Aktivität der DNA-Polymerase ermöglicht einige Voraussagen, die mit neuen Experimenten überprüft werden könnten.^[118] Erstens sagt es voraus, dass Basenpaare zwischen unpolaren, keine Wasserstoffbrücken bildenden Resten im Allgemeinen repliziert werden können, solange sie sich sterisch in die Doppelhelix einpassen lassen. Hauptfaktoren für die Effizienz sind die Vermeidung sterischer Kollisionen und die Fähigkeit zur Stapelbildung. Zweitens lässt sich zumindest ein gewisses Maß an Selektivität zwischen verschiedenen, keine Wasserstoffbrücken bildenden Basen durch sorgfältige Auswahl ihrer molekularen Gestalt erreichen. Wenn ein selektives Paar, das keine Paarungen mit sich selbst eingeht (wie bei F), das Ziel ist, muss eine sich selbst ausschließende Form Teil des Designs sein. Ein erfolgreiches Basenpaar sieht also aus wie zwei benachbarte Stücke eines Puzzles. Schließlich sagt die Formausschluss-Hypothese voraus, dass Purin- und Pyrimidinformen keine Voraussetzung für eine effiziente Synthese sind; jeder flache aromatische Rest sollte akzeptabel sein, solange das Paar geometrisch in die Struktur des DNA-Duplex passt.

5.8. Der Entwurf von Basenpaaren der zweiten Generation

Abbildung 12 zeigt die Strukturen eines neuen Basenpaares, mit dem einige der oben aufgeführten Vorhersagen getestet werden sollen. Dieses Paar, P-φ, ist ein recht extremes Beispiel, um das Konzept zu testen, dass Pyrimidin- und

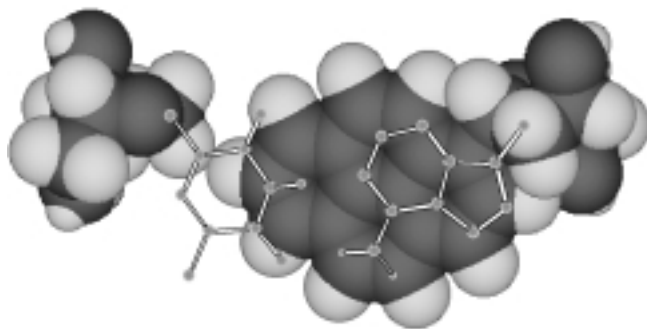


Abbildung 12. Raumfüllendes Modell einer Pyren-„Base“ gegenüber von einer abasischen Stelle in einem DNA-Duplex in der B-Form. Zu Vergleichszwecken ist dem Modell ein Watson-Crick-A-T-Basenpaar überlagert.

Purinformen nicht unbedingt für die Polymeraseaktivität benötigt werden. Das Paar besteht aus einem Pyrendesoxynucleosid (**26**) und einem abasischen Nucleosid (**32**). In diesem Paar ist ein Partner sterisch möglichst klein (die „Base“ ist ein Proton) und der andere ist möglichst groß, denn er füllt die Lücke, die entsteht, wenn die gegenüberliegende Base entfernt wird. Das neue Verbindungspaar wurde zunächst ohne Enzyme^[72] und danach als Substrat für die DNA-Synthese mit Polymerasen getestet.^[134]

In Tabelle 5 sind die Daten der Paarungseigenschaften von Pyren mit dem abasischen Nucleosid in einem DNA-Duplex

Tabelle 5. Freie Energien und Schmelztemperaturen von DNA-Duplexen, die Pyren und abasische Stellen enthalten.

Basenpaar X-Y ^[a]	T_m [°C] ^[b]	ΔT_m [°C]	$-\Delta G_{37}^0$ [kcal mol ⁻¹] ^[c]
T-A	43.2	–	12.6
P-A	38.7	4.5	10.8
P-C	37.6	5.6	10.5
P-T	36.4	6.8	9.6
P-G	38.2	5.0	10.7
P- ϕ	41.0	2.2	11.6
P-P	42.9	0.3	11.8
ϕ -A	22.0	21.2	7.0
ϕ -C	20.9	22.3	6.7
ϕ -T	18.0	25.2	6.2
ϕ -G	23.1	20.1	7.2

[a] Gemessen in der Sequenz d(CTTTCXTTCTT)·d(AAGAAAG) in einem Puffer, der 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ und 10 mM Na-PIPES enthält (pH 7.0). DNA-Konzentration: 5.0 μ M. Die Fehlerbreite von T_m beträgt $\pm 5\%$. [b] Daten von Matray und Kool.^[72] [c] Die Werte wurden aus Ausgleichskurven von mindestens fünf Denaturierungsversuchen erhalten.

ohne Enzyme gezeigt.^[72] Interessanterweise wirkt das „Paar“ aus Pyren und einem abasischen Nucleosid fast so stabilisierend wie ein A-T-Paar in der gleichen Sequenz. Dies überrascht, denn abasische Stellen destabilisieren die DNA üblicherweise, wenn sie mit einer natürlichen Base „gepaart“ werden^[66] (siehe Beispiele in Tabelle 5). Als Resultat der P- ϕ -Stabilität ergibt sich eine hohe Selektivität der abasischen Stelle für eine Paarung mit Pyren gegenüber der mit natürlichen Basen. Allerdings weist Pyren nur eine geringe Bevorzugung für eine Paarung mit ϕ anstelle der natürlichen Basen auf. Wir nehmen an, dass im letzteren Fall Pyren zwischen die Basen des gegenüberliegenden Stranges interkaliert ist (Strukturuntersuchungen zu dieser Frage sind gerade im Gange).

Dann untersuchten wir die schwierigeren Fragen: Würde das ungewöhnlich große, keine Wasserstoffbrückenbindungen bildende Pyren-Nucleotid ein Substrat für DNA-Polymerasen sein können? Würde die abasische Stelle als funktionelle Matrize wirken? Und wäre die Effizienz hoch oder niedrig? Würde überhaupt Selektivität beobachtet werden können, da es keine Wasserstoffbrückenbindungen in dem Paar gibt? Um diese Fragen zu untersuchen, synthetisierten wir das Desoxynucleosid-5'-triphosphat von P (dPTP) und DNA-Matrizenstränge, die das abasische Analogon ϕ enthielten. Als Polymerasen benutzten wir die Klenow-DNA-Polymerase und die T7-DNA-Polymerase.

Überraschenderweise ist dPTP tatsächlich ein Substrat für DNA-Polymerasen (Abbildung 13).^[134] Noch überraschender ist, dass es ein sehr gutes Substrat ist, dessen Effizienz an die der natürlichen Basenpaare heranreicht, und ein sehr selektives, das viel effizienter gegenüber von ϕ eingebaut wird als gegenüber von natürlichen Basen oder einem anderen Pyren (Abbildung 14). Wieder zwingt die Polymerase der Pyrenbase Eigenschaften auf, die diese in der DNA ohne Enzym nicht aufweist.

Die klaren Schlussfolgerungen aus dieser Arbeit sind: 1) Wasserstoffbrückenbindungen sind nicht nötig, um die sehr hohe Effizienz bei der Synthese von Basenpaaren zu erreichen. 2) Eine signifikante Selektivität kann ohne Wasser-

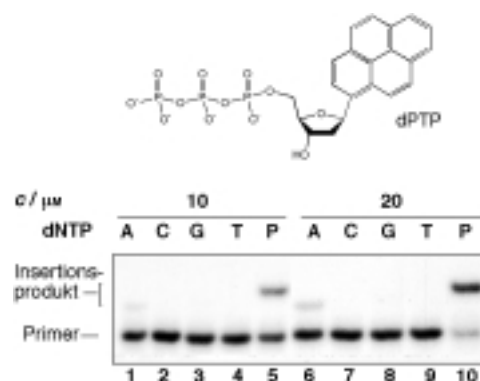


Abbildung 13. a) Struktur von dPTP, einem effizienten Substrat für DNA-Polymerasen. b) Autoradiogramm, das den Einbau einer der vier natürlichen Nucleotide gegenüber von dPTP oder einer abasischen Stelle zeigt. Sequenzen siehe Abbildung 5a.^[134]

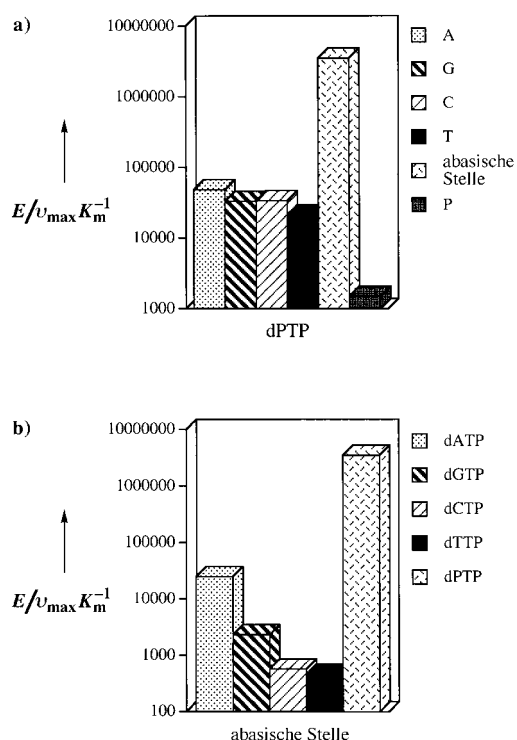


Abbildung 14. Histogramme, die die Effizienz des dPTP-Einbaus im Gleichgewicht zeigen. a) Histogramm zur Selektivität des Einbaus von dPTP, das zeigt, dass der bevorzugte Einbau gegenüber von einer abasischen Stelle erfolgt und nicht gegenüber von einer der vier natürlichen Basen oder Pyren selbst.^[134] b) Histogramm zur Zuverlässigkeit des Einbaus der vier natürlichen Nucleotide und von dPTP in die Primer-Matrize aus Abbildung 5a, in der X die abasische Stelle markiert.^[134]

stoffbrückenbindungen erzielt werden. Im vorliegenden Fall ergibt sich die Selektivität allein aus sterischen Effekten. 3) Andere Basenstrukturen als purin- oder pyrimidinähnliche können ebenfalls sehr effektive Substrate sein, solange sie sterisch mit einem geeigneten Partner zusammenpassen. Dies ist ein gutes Omen für den Entwurf neuer Basenpaare in der Zukunft.

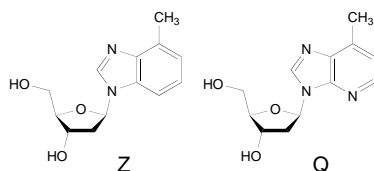
Es sollte betont werden, dass das P- ϕ -Paar sich mindestens in einer wichtigen Hinsicht von einem natürlichen Basenpaar unterscheidet. Nach dem Einbau des Pyrenrestes wird die DNA-Synthese angehalten, der Strang wird nicht weiter

verlängert.^[134] Es ist noch unklar, wieso dies geschieht, aber es könnte an den Eigenschaften der abasischen Stelle liegen. So verläuft die Verlängerung des DNA-Stranges mit einem abasischen Rest ebenfalls sehr schlecht, sogar dann, wenn eine natürliche Base (Adenin) im Gegenstrang eingebaut wird.^[135] In der Untersuchung mit Pyren nutzten wir diesen Kettenabbruch nach dem Pyreneinbau, indem wir es als DNA-Sequenzierungsreagens benutzten, um abasische Stellen in der DNA nachzuweisen.

5.9. Andere Polymerase-Effekte

Die in diesem Aufsatz beschriebenen Ergebnisse stützen die Auffassung, dass die Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen für die DNA-Replikation nicht essentiell sind, zumindest nicht für ein isoliertes Basenpaar. In gewisser Weise ist dies sinnvoll, weil diese Bindungen sich im Inneren der DNA-Helix befinden, sodass ihr Vorhandensein oder ihr Fehlen vom Enzym anhand der Struktur nicht leicht aufgespürt werden kann. Wie kürzlich durchgeführte Röntgenstrukturanalysen ergaben, machen sich Polymerasen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Protein und der DNA zunutze.^[123, 128, 129, 131, 136] Diese Wechselwirkungen bestehen zwischen Seitenketten des Proteins, die als Wasserstoffbrückenbindungs-Donoren wirken, und Acceptorgruppen in der kleinen Furche der DNA („minor groove binding track“).^[137]

Dies kann zur Erklärung beitragen, warum manche unpolare Basenanaloge wie das Benzimidazolanalogen **Z** gut eingebaut werden, dann aber die weitere Kettenverlängerung erheblich hemmen.^[117] Wir schlugen vor, dass bei der Verschiebung von **Z** innerhalb des aktiven Zentrums (die erforderlich ist, um das nächste Nucleotid einzubauen) die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Donor im aktiven Zentrum und der vorhergehenden Base gebrochen wird. Dadurch wird die Base desolvatisiert, was energetisch recht aufwändig ist und dazu führt, dass das Enzym abdissoziiert. Wir bewiesen dies, indem wir ein neues Analogon, **Q**, synthetisierten, das die gleiche Struktur wie **Z** hat (und wie diese Verbindung ebenfalls keine Watson-Crick-Wasserstoffbrücken bildende Gruppen aufweist), aber ein Stickstoffatom enthält, das zur kleinen Furche hin weist (Schema 10). Diese modifizierte Base ist sowohl für die Insertion als auch für die weitere Kettenelongation ein sehr gutes Substrat (Abbildung 15).^[138]



Schema 10. Struktur des unpolaren Isosters **Q** und zum Vergleich des vorher beschriebenen unpolaren Isosters **Z**. Die beiden Analoga wurden benutzt, um die Wechselwirkungen zwischen DNA und Polymerasen in der kleinen Furche der Helix zu untersuchen.

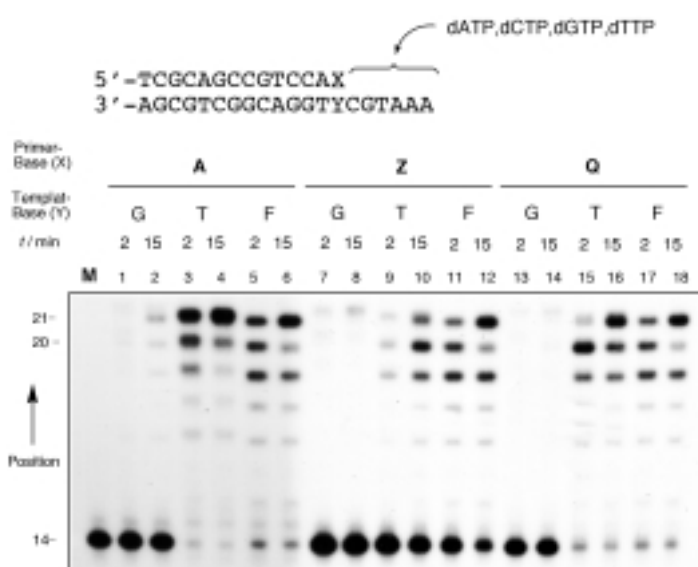


Abbildung 15. Autoradiogramm, das die Wechselwirkungen in der kleinen Furche bei der Strangverlängerung mit normalen und modifizierten Basenpaaren zeigt.^[138] Zu beachten ist die höhere Effizienz der Primer-Verlängerung mit **Q** (Spuren 15–18) verglichen mit der mit **Z** (Spuren 9–12).

6. Schlussfolgerungen

In Abwesenheit von Enzymen scheinen Wasserstoffbrückenbindungen einen nennenswerten Beitrag zur Stabilisierung existierender DNA-Helices zu leisten und auch die Paarungsspezifität zu erhöhen. Daneben scheint aber auch die Basenstapelung ein sehr wichtiger Faktor zur Stabilisierung der Doppelhelix zu sein, sogar für natürliche DNA-Basen, die im Vergleich mit anderen, weniger polaren Molekülen relativ schwache Stapelwechselwirkungen eingehen.

Andererseits sind Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen bei der DNA-Replikation nicht notwendig, um ein Basenpaar mit hoher Effizienz zu replizieren. Außerdem kann eine signifikante Selektivität auch durch sterische Effekte allein erreicht werden. Es muss aber noch überprüft werden, ob sterische Effekte in Abwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen den sehr hohen Grad an Zuverlässigkeit sicherstellen können, den man bei den üblichen über Wasserstoffbrückenbindungen gebundenen Basenpaaren findet. Dennoch muss man unbedingt große Aufmerksamkeit auf sterische und geometrische Faktoren in der DNA richten, wenn man verstehen will, wie Basenpaare repliziert werden und wenn man neue replizierbare Basenpaare entwerfen will.

Außerdem ist klar geworden, dass Polymerasen der DNA enge geometrische Einschränkungen aufzwingen, auch über das hinaus, was bereits an Einschränkungen durch das DNA-Rückgrat besteht. Daher korreliert die Stabilität der Basenpaare in Abwesenheit von Enzymen kaum mit der Replizierbarkeit durch ein Enzym. Dies bedeutet, dass sogar Basenpaare, die in der DNA allein instabil und unselektiv sind, von einem Enzym mit hoher Spezifität und Effizienz gebildet werden können.

7. Künftige Arbeiten

Es bleibt noch viel Arbeit auf diesem Gebiet zu tun. Die Synthese neuer Analoga ist erforderlich, um die Effekte subtiler Änderungen der Molekülgestalt auf die Selektivität bei der Basenpaar-Synthese zu testen. Außerdem könnte durch Untersuchungen mit einer größeren Zahl von Polymerasen die Allgemeingültigkeit der beobachteten Effekte überprüft werden. Tests mit anderen Polymeraseklassen wie RNA-Polymerasen und reversen Transkriptasen wären ebenfalls von Interesse.

Diese Analoga könnten auch bei der Untersuchung anderer Aktivitäten von Polymerasen wertvoll sein. So unterscheidet sich die Verlängerung von Basenpaaren vom Einbau von Basenpaaren und verläuft über andere Wechselwirkungen mit dem Enzym. Außerdem könnte das Korrekturlesen (Korrektur von Fehlpaarungen) der Polymerasen untersucht werden. In diesem Fall kann eine ähnliche Fragestellung angegangen werden: Wird die Geschwindigkeit, mit der ein Basenpaar durch den Korrekturapparat der Polymerase entfernt wird, von den Wasserstoffbrückenbindungen oder von der Gestalt der Basenpaare bestimmt?^[139, 140]

Auch andere Wechselwirkungen zwischen Proteinen und DNA sind von Interesse. Da das Difluortoluol-Adenin-Paar die DNA nicht verzerrt,^[56] könnte das Analogon sehr nützlich sein, um die Bedeutung der Wasserstoffbrückenbindungen und der Solvation für die Erkennung der DNA-Struktur durch das Protein auszuloten. Daneben könnte es als Struktursonde für NMR-spektroskopische Messungen dienen: Das Analogon F enthält zwei Fluorsubstituenten, von denen jedes im Zentrum einer der DNA-Furchen liegt, und ist daher eine nützliche ¹⁹F-Sonde für NOE-Messungen.^[56]

Weiterhin werden auch die DNA-Reparaturmechanismen derzeit intensiv untersucht. Beispielsweise entfernen die Reparaturenzyme, die Basen ausschneiden, fehlgepaarte DNA-Basen, indem sie sie aus der Helix herausdrehen und die C-N-Glycosidbindung hydrolysieren.^[141] Analoga wie F könnten von solchen Enzymen nicht hydrolysiert werden und könnten daher als spezifische Inhibitoren in synthetischen DNA-Substratsequenzen dienen.

Neben der Nutzung solcher Analoga als biochemische Werkzeuge für die Untersuchung von Mechanismen und Strukturen sehen wir eine Reihe potentiell nützlicher praktischer biomedizinischer Anwendungen. Analoga wie das Pyrennucleosid P könnten eine Helix durch ihre Fähigkeit zu einer widerstandsfähigen Basenstapelung stark stabilisieren.^[77] Die Hybridisierung wird vielfach in genomischen High-Throuput-Strategien benutzt.

Wir sind allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, die zu den hier vorgestellten Forschungsergebnissen beigetragen haben, zu Dank verpflichtet. Besonders erwähnen möchten wir Dr. Barbara Schweitzer, Dr. Sean Moran, Dr. Dongyu Liu, Dr. Tracy Matray, Dr. Rex Ren, Dr. Narayan Chaudhuri und Robin Carroll. Die Arbeit wurde von den National Institutes of Health (GM52965) gefördert. J.C.M.

dankt dem spanischen Bildungsministerium für ein Postdoc-stipendium.

Eingegangen am 4. Juni 1999 [A 348]
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737–738.
- [2] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, New York, **1984**.
- [3] N. C. Seeman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 519–526.
- [4] C. Mao, W. Sun, N. C. Seeman, *Nature* **1997**, 386, 137–138.
- [5] N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, 27, 225–248.
- [6] N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3408–3428; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3220–3238.
- [7] E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, N. C. Seeman, *Nature* **1998**, 394, 539–544.
- [8] C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, 397, 144–146.
- [9] R. L. Letsinger, S. Chaturvedi, *Bioconjugate Chem.* **1998**, 9, 826–830.
- [10] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, 382, 607–609.
- [11] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, P. G. Schultz, *Nature* **1996**, 382, 609–611.
- [12] N. C. Chaudhuri, R. X.-F. Ren, E. T. Kool, *Synlett* **1997**, 341.
- [13] B. A. Schweitzer, E. T. Kool, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 7238–7242.
- [14] F. H. Martin, M. M. Castro, F. Aboul-ela, I. Tinoco, Jr., *Nucleic Acid Res.* **1985**, 13, 8927–8238.
- [15] Y. Kawase, S. Iwai, H. Inoue, K. Miura, E. Ohtsuka, *Nucleic Acid Res.* **1986**, 14, 7727–7736.
- [16] B. L. Gaffney, L. A. Marky, R. A. Jones, *Tetrahedron* **1984**, 40, 3–13.
- [17] D. H. Turner, N. Sugimoto, R. Kierzek, S. D. Dreiker, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3783–3785.
- [18] I. K. Yanson, A. B. Tepitsky, L. F. Sukhodub, *Biopolymers* **1979**, 18, 1149–1170.
- [19] A. R. Fersht, *Trends Biochem. Sci.* **1987**, 12, 301–304.
- [20] I. R. Gould, P. R. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2493–2499.
- [21] Y.-P. Pang, J. L. Miller, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1717–1725.
- [22] R. A. Friedman, B. Honig, *Biophys. J.* **1995**, 69, 1528–1535.
- [23] L. F. Newcomb, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4993–4994.
- [24] C. A. Hunter, *J. Mol. Biol.* **1993**, 230, 1025–1054.
- [25] D. B. Smithrud, T. B. Wyman, F. A. Diederich, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5420–5426.
- [26] V. M. Rotello, E. A. Viani, G. Deslongchamps, B. A. Murray, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 797–798.
- [27] E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 6265–6266.
- [28] F. Aboul-ela, D. Koh, I. Tinoco, Jr., F. H. Martin, *Nucleic Acid Res.* **1985**, 13, 4811–4824.
- [29] H. Werntges, G. Steger, D. Riesner, H. J. Fritz, *Nucleic Acid Res.* **1986**, 14, 3773–3791.
- [30] M. Kouchakdjian, B. F. Li, P. F. Swann, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.* **1988**, 202, 139–155.
- [31] W. N. Hunter, G. Kneale, T. Brown, D. Rabinovich, O. Kennard, *J. Mol. Biol.* **1986**, 190, 605–618.
- [32] H. T. Allawi, J. SantaLucia, Jr., *Nucleic Acid Res.* **1998**, 26, 4925–4934.
- [33] L. A. Loeb, T. A. Kunkel, *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, 51, 429–457.
- [34] A. Kornberg, T. A. Baker, *DNA Replication*, 2. Aufl., Freeman, New York, **1992**.
- [35] S. J. Benkovic, C. E. Cameron, *Methods Enzymol.* **1995**, 262, 257–269.
- [36] K. A. Johnson, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 685–713.
- [37] M. F. Goodman, S. Creighton, L. B. Bloom, J. Petruska, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1993**, 28, 83–126.
- [38] H. Echols, M. F. Goodman, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, 60, 477–511.
- [39] C. M. Joyce, T. A. Steitz, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 777–822.
- [40] C. M. Joyce, T. A. Steitz, *J. Bacteriol.* **1995**, 177, 6321–6329.
- [41] L. Stryer, *Biochemistry*, Freeman, New York, **1995**.

- [42] J. D. Watson, M. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, A. M. Weiner, *Molecular Biology of the Gene*, Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, **1987**.
- [43] K. M. Guckian, E. T. Kool, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2942–2945; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2825–2828.
- [44] K. M. Guckian, J. C. Morales, E. T. Kool, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9652–9656.
- [45] A. N. Chekhlov, *J. Struct. Chem.* **1995**, *36*, 155–161.
- [46] D. W. Young, P. Tollin, H. R. Wilson, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1969**, *25*, 1423.
- [47] L. Shimon, J. P. Glusker, *Struct. Chem.* **1994**, *5*, 383.
- [48] J. A. K. Howard, V. J. Hoy, D. O'Hagan, G. T. Smith, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12613–12622.
- [49] V. R. Thalladi, H.-C. Weiss, D. Bläser, R. Boese, A. Nangia, G. R. Desiraju, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8702–8710.
- [50] H. Plenio, R. Diodone, *Chem. Ber.* **1997**, *130*, 633–640.
- [51] T. A. Evans, K. R. Seddon, *Chem. Commun.* **1997**, 2023–2024.
- [52] M. Meyer, J. Suhnel, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1997**, *15*, 619–624.
- [53] X. Wang, K. N. Houk, *Chem. Commun.* **1998**, 2631–2632.
- [54] D. Barsky, E. T. Kool, M. Colvin, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1999**, *16*, 1119–1134.
- [55] B. A. Schweitzer, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1863–1872.
- [56] K. M. Guckian, T. R. Krugh, E. T. Kool, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 954–959.
- [57] R. Eritja, D. M. Horowitz, P. A. Walker, J. P. Ziehler-Martin, M. S. Boosalis, M. F. Goodman, K. Itakura, B. E. Kaplan, *Nucleic Acid Res.* **1986**, *14*, 8135–8153.
- [58] B. A. Connolly, P. C. Newman, *Nucleic Acid Res.* **1989**, *17*, 4957–4973.
- [59] S. Hildbrand, A. Blaser, S. P. Parel, C. J. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5499–5511.
- [60] B. Gildea, L. W. McLaughlin, *Nucleic Acid Res.* **1989**, *17*, 2261–2280.
- [61] S. M. Law, R. Eritja, M. F. Goodman, K. J. Breslauer, *Biochemistry* **1996**, *35*, 12329–12337.
- [62] P. K. t. Lin, D. M. Brown, *Nucleic Acid Res.* **1989**, *17*, 10373–10383.
- [63] B. F. L. Li, C. B. Beese, P. F. Swann, *Biochemistry* **1987**, *26*, 1086–1093.
- [64] B. L. Gaffney, R. A. Jones, *Biochemistry* **1989**, *28*, 5881–5889.
- [65] H. Nishio, A. Ono, A. Matsuda, T. Ueda, *Nucleic Acid Res.* **1992**, *20*, 777–782.
- [66] T. A. Millican, G. A. Mock, M. A. Chauncey, T. P. Patel, M. A. Eaton, J. Gunning, S. D. Cutbush, S. Neidle, J. Mann, *Nucleic Acid Res.* **1984**, *12*, 7435–7453.
- [67] D. Loakes, F. Hill, D. M. Brown, S. A. Salisbury, *J. Mol. Biol.* **1997**, *270*, 426–435.
- [68] R. Nichols, P. A. Andrews, P. Zhang, B. E. Bergstrom, *Nature* **1994**, *369*, 492–493.
- [69] A. Chollet, E. Kawashima, *Nucleic Acid Res.* **1988**, *16*, 305–317.
- [70] J. A. Piccirilli, T. Krauch, S. E. Moroney, S. A. Benner, *Nature* **1990**, *343*, 33–37.
- [71] C. Roberts, R. Bandaru, C. Switzer, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4640–4649.
- [72] T. J. Matray, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6191–6192.
- [73] V. A. Buckin, *Biophys. Chem.* **1988**, *29*, 283–292.
- [74] J. Gao, *Biophys. Chem.* **1994**, *51*, 253–261.
- [75] S. H. Gellman, T. S. Haque, L. F. Newcomb, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 3523–3525.
- [76] R. A. Friedman, B. Honig, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 3525–3526.
- [77] K. M. Guckian, B. A. Schweitzer, R. X.-F. Ren, C. J. Sheils, P. A. Paris, D. C. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8182–8183.
- [78] D. H. Turner, N. Sugimoto, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1988**, *17*, 167–192.
- [79] M. Senior, R. A. Jones, K. J. Breslauer, *Biochemistry* **1988**, *27*, 3879–85.
- [80] N. Sugimoto, A. Matsumura, K. Hasegawa, M. Sasaki, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1991**, *25*, 51–52.
- [81] M. H. Werner, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Science* **1996**, *271*, 778–784.
- [82] C. A. Bewley, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 105–131.
- [83] F. M. Jucker, A. Pardi, *Biochemistry* **1995**, *34*, 14416–14427.
- [84] X.-F. Ren, B. A. Schweitzer, C. J. Sheils, E. T. Kool, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 834–837; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 743–746.
- [85] G. Felsenfeld, H. T. Miles, *Annu. Rev. Biochem.* **1967**, *36*, 407–448.
- [86] D. Pörschke, *Eur. J. Biochem.* **1973**, *39*, 117–126.
- [87] C. S. Olsthoorn, L. J. Bostelaar, J. F. De Rooij, J. H. Van Boom, C. Altona, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *115*, 309–321.
- [88] T. E. Spratt, D. E. Levy, *Nucleic Acid Res.* **1997**, *25*, 3354–3361.
- [89] P. Stazewski, C. Tamm, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 37–59; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 36–57.
- [90] C. Switzer, S. E. Moroney, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8322–8323.
- [91] J. Horlacher, M. Hottiger, V. N. Podust, U. Hubscher, S. A. Benner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6329–6333.
- [92] S. Shibutani, M. Takeshita, A. P. Grollman, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 13916–13922.
- [93] M. Takeshita, C. N. Chang, F. Johnson, S. Will, A. P. Grollman, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 10171–10179.
- [94] S. K. Randall, R. Eritja, B. E. Kaplan, J. Petruska, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 6864–6870.
- [95] C. W. Shearman, L. A. Loeb, *J. Mol. Biol.* **1979**, *128*, 197–218.
- [96] R. M. Schaaper, B. W. Glickman, L. A. Loeb, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 3480–3485.
- [97] L. A. Loeb, B. D. Preston, *Annu. Rev. Genet.* **1986**, *20*, 201–230.
- [98] B. Strauss, S. Rabkin, D. Sagher, P. Moore, *Biochimie* **1982**, *64*, 829–838.
- [99] B. S. Strauss, *Bioessays* **1991**, *13*, 79–84.
- [100] D. Sagher, B. Strauss, *Biochemistry* **1983**, *22*, 4518–4526.
- [101] R. M. Schaaper, T. A. Kunkel, L. A. Loeb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 487–491.
- [102] C. W. Lawrence, A. Borden, S. K. Banerjee, J. E. LeClerc, *Nucleic Acid Res.* **1990**, *18*, 2153–2157.
- [103] T. Paz-Elizur, M. Takeshita, Z. Livneh, *Biochemistry* **1997**, *36*, 1766–73.
- [104] R. D. Beger, P. H. Bolton, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15565–15573.
- [105] P. Cuniasse, L. C. Sowers, R. Eritja, B. Kaplan, M. F. Goodman, J. A. Cognet, M. LeBret, W. Guschlbauer, G. V. Fazakerley, *Nucleic Acid Res.* **1987**, *15*, 8003–8022.
- [106] Z. Lin, K. N. Hung, A. P. Grollman, C. de los Santos, *Nucleic Acid Res.* **1998**, *26*, 2385–2391.
- [107] P. Cuniasse, G. V. Fazakerley, W. Guschlbauer, B. E. Kaplan, L. C. Sowers, *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 303–314.
- [108] I. Wong, S. S. Patel, K. A. Johnson, *Biochemistry* **1991**, *30*, 526–537.
- [109] D. L. Sloane, M. F. Goodman, H. Echols, *Nucleic Acid Res.* **1988**, *16*, 6465–6475.
- [110] J. Petruska, M. F. Goodman, M. S. Boosalis, L. C. Sowers, C. Cheong, I. Tinoco, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6252–6256.
- [111] R. D. Kuchta, V. Mizrahi, P. A. Benkovic, K. A. Johnson, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1987**, *26*, 8410–8417.
- [112] R. D. Kuchta, P. Benkovic, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1988**, *27*, 6716–6725.
- [113] K. Bebenek, C. M. Joyce, M. P. Fitzgerald, T. A. Kunkel, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 13878–13887.
- [114] S. Moran, R. X.-F. Ren, S. Rumney IV, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2056–2057.
- [115] S. Moran, R. X. Ren, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10506–10511.
- [116] D. Liu, S. Moran, E. T. Kool, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 919–926.
- [117] J. C. Morales, E. T. Kool, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 950–954.
- [118] E. T. Kool, *Biopolymers* **1998**, *48*, 3–17.
- [119] S. Langouet, M. Muller, F. P. Guengerich, *Biochemistry* **1997**, *36*, 6069–79.
- [120] V. Litinski, A. Chenna, J. Sagi, B. Singer, *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 1609–1615.
- [121] J. P. Seiler, *Mutat. Res.* **1973**, *17*, 21–25.
- [122] U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1745–1747; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1655–1657.
- [123] H. Pelletier, M. R. Sawaya, A. Kumar, S. H. Wilson, J. Kraut, *Science* **1994**, *264*, 1891–903.
- [124] T. A. Kunkel, S. H. Wilson, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 95–9.
- [125] W. A. Beard, S. H. Wilson, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, R7–R13.
- [126] L. S. Beese, V. Derbyshire, T. A. Steitz, *Science* **1993**, *260*, 352–355.

- [127] Y. Kim, S. H. Eom, J. Wang, D. S. Lee, S. W. Suh, T. A. Steitz, *Nature* **1995**, 376, 612–616.
- [128] S. Doublié, S. Tabor, A. M. Long, C. C. Richardson, T. Ellenberger, *Nature* **1998**, 391, 251–258.
- [129] J. R. Kiefer, C. Mao, J. C. Braman, L. S. Beese, *Nature* **1998**, 391, 304–307.
- [130] E. Arnold, J. Ding, S. H. Hughes, Z. Hostomsky, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 27–38.
- [131] H. Huang, R. Chopra, G. L. Verdine, S. C. Harrison, *Science* **1998**, 282, 1669–1675.
- [132] B. T. Eger, R. D. Kuchta, S. S. Carroll, P. A. Benkovic, M. E. Dahlberg, C. M. Joyce, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1991**, 30, 1441–1448.
- [133] J. A. Hirsch, *Table of conformational energies, Vol. 1*, Interscience, New York, **1967**.
- [134] T. J. Matray, E. T. Kool, *Nature* **1999**, 399, 704–708.
- [135] H. Cai, L. B. Bloom, R. Eritja, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 23567–23572.
- [136] S. H. Eom, J. Wang, T. A. Steitz, *Nature* **1996**, 382, 278–281.
- [137] K. Bebenek, W. A. Beard, T. A. Darden, L. Li, R. Prasad, B. A. Luton, D. G. Gorenstein, S. H. Wilson, T. A. Kunkel, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 194–197.
- [138] J. C. Morales, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2323–2324.
- [139] M. F. Goodman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 10493–10495.
- [140] S. Brenowitz, S. Kwack, M. F. Goodman, M. O'Donnell, H. Echols, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 7888–7892.
- [141] S. S. Parikh, C. D. Mol, D. J. Hosfield, J. A. Tainer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 37–47.
- [142] T. A. Steitz, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, 3, 31–38.
- [143] T. A. Steitz, S. J. Smerdon, J. Jager, C. M. Joyce, *Science* **1994**, 266, 2022–2025.

Zitieren von Zeitschriften

Im Literaturverzeichnis von Beiträgen in der *Angewandten Chemie* soll der Name einer Zeitschrift nicht durch „*ibid.*“ ersetzt werden, wenn sie mehrmals hintereinander zitiert wird, da in elektronischen Datenbanken eine Suche nach „*ibid.*“ nicht sinnvoll ist und für die Zukunft geplante Hyperlinks zu zitierten Beiträgen der *Angewandten Chemie* bei der elektronischen Version der Zeitschrift nicht möglich sind, wenn die Abkürzung „*ibid.*“ verwendet wird. Deshalb sollen *immer* die nach dem Chemical Abstracts Service Source Index abgekürzten Namen einer Zeitschrift aufgeführt werden. Entsprechend sollten stets alle Autoren angegeben werden, wenn mehrere Beiträge derselben Autoren hintereinander zitiert werden. Beispiele:

- [1] a) J. Guo, K. J. Duffy, K. L. Stevens, P. I. Dalko, R. M. Roth, M. M. Hayward, Y. Kishi, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 198–202; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 187–190; b) M. M. Hayward, R. M. Roth, K. J. Duffy, P. I. Dalko, K. L. Stevens, J. Guo, Y. Kishi, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 202–206; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 190–196.
- [2] a) R. Mokaya, W. Jones, *Chem. Commun.* **1996**, 981–982; b) R. Mokaya, W. Jones, *Chem. Commun.* **1996**, 983–984.