

Wechselwirkungen zwischen Purin- und Pyrimidinbasen von Nukleosiden in einem chromatographischen System, 1. Mitt.:¹

Auf einer Paarung komplementärer Basen beruhende säulenchromatographische Nukleosidtrennungen

Von

H. Tuppy und **E. Küchler**

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 10 Abbildungen

(Eingegangen am 30. September 1964)

Es wird ein chromatographisches System beschrieben, das eine Trennung von Nukleosiden auf Grund der Wechselwirkungen zwischen komplementären Purin- und Pyrimidinbasen erlaubt. Wenn man Nukleosidgemische in gepufferter wässriger Lösung ein Chromatographierrohr durchströmen lässt, das mit einem unlöslichen Harz beschickt ist, an das zahlreiche Moleküle einer Purin- oder Pyrimidinbase kovalent gebunden sind, werden verschiedene Nukleoside vom Säulenmaterial verschieden stark zurückgehalten und dadurch voneinander getrennt. Die beobachteten Retentionen lassen sich durch die Ausbildung intermolekularer Komplexe zwischen den am Harz fixierten und den in der mobilen Phase chromatographierten Basen — ähnlich der Basenpaarung im DNA-Doppelhelix-Modell — erklären.

A chromatographic system is described which will separate nucleosides on account of interactions between complementary purine and pyrimidine bases. Columns were prepared from a granular resin to which numerous molecules of a purine or a pyrimidine base had been bound covalently. When mixtures of nucleosides dissolved in aqueous buffer were allowed to pass through such columns, separations occurred as a result of dissimilar retentions of different nucleosides on the resin beds. The observed retentions can be accounted for by the formation of intermolecular complexes between the bases fixed to the resin and the nucleoside bases chromatographed in the mobile phase,

¹ Vorläufige Mitt.: *H. Tuppy* und *E. Küchler*, *Biochim. Biophys. Acta* [Amsterdam] **80**, 669 (1964).

in analogy to the pairing of bases in the two-stranded DNA molecule.

Das von *Watson* und *Crick*² entworfene und heute allgemein anerkannte Modell der *DNA*-Struktur* ist durch spezifische Wechselwirkungen zwischen purin- und pyrimidinhaltigen Nukleotiden in zwei miteinander gepaarten Polynukleotidsträngen gekennzeichnet; jede Purinbase (Adenin bzw. Guanin) ist jeweils mit einer „komplementären“ Pyrimidinbase (Thymin bzw. Cytosin) durch zwei oder drei Wasserstoffbindungen verknüpft³. Das Auftreten spezifischer Wechselwirkungen zwischen Purinen und Pyrimidinen ist jedoch nicht auf *DNA* beschränkt. *Rich* und *Davies*⁴ beobachteten beim Mischen wäßriger Lösungen von Polyadenylsäure und Polyuridylsäure eine auf Basenpaarung zwischen Adenin und Uracil beruhende Entstehung von Polyadenyl—Polyuridylsäure-Doppelschrauben, die mit einer Abnahme der Ultraviolet-Extinktion bei 260 m μ verbunden war. Hypochromie-Effekte wurden später auch bei der Vereinigung anderer, komplementäre Basen enthaltender Polynukleotide gefunden^{5, 6}. Wenn wäßrige Lösungen von Nukleosiden oder Nukleotiden miteinander gemischt wurden, traten bei 260 m μ keine hypochromen Effekte auf^{7, 8}, wohl aber stellten *Basu* und *Loh* beim Zusammenbringen von Thymidin und Adenosin in 70proz. wäßriger Glukose-Lösung geringe Abweichungen von der Additivität der Extinktionen im Wellenlängenbereich zwischen 320 und 410 m μ fest⁹. Röntgenstrukturuntersuchungen homogener Mischkristalle von Purin- und Pyrimidinderivaten haben erwiesen, daß die komplementären Basen im Kristallgitter paarweise aneinandergelagert sind; bei Derivaten des Guanins und Cytosins entsprach die Art der Wasserstoffbrückenbildung zwischen den Basen der von *Pauling* und *Corey* für *DNA* vorgeschlagenen¹⁰⁻¹², während in der Adenin—Thymin- (bzw.

* *DNA* = Deoxy-ribonukleinsäure.

² *J. D. Watson* und *F. H. C. Crick*, *Nature* [London] **171**, 737, 964 (1953).

³ *L. Pauling* und *R. B. Corey*, *Arch. Biochem. Biophysics* **65**, 164 (1956).

⁴ *A. Rich* und *D. R. Davies*, *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 3548 (1956).

⁵ *P. B. Sigler*, *D. R. Davies* und *H. Todd Miles*, *J. Molec. Biol.* **5**, 709 (1962).

⁶ *P. T. Gilham*, *J. Amer. Chem. Soc.* **84**, 1311 (1962).

⁷ *R. M. Bock*, in *P. Boyer*, *H. Lardy* und *K. Myrbäck*; *The Enzymes*, Vol. **2**, S. 10, Acad. Press, New York, 1960.

⁸ *W. H. Boldingh* und *H. Veldstra*, *Biochim. Biophys. Acta* [Amsterdam] **51**, 196 (1961).

⁹ *S. Basu* und *L. Loh*, *Biochim. Biophys. Acta* [Amsterdam] **76**, 131 (1963).

¹⁰ *E. J. O'Brien*, *J. Molec. Biol.* **7**, 107 (1963).

¹¹ *H. M. Sobell*, *K. Tomita* und *A. Rich*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **49**, 885 (1963).

¹² *A. E. V. Haschemeyer* und *H. M. Sobell*, *Nature* [London] **202**, 969 (1964).

—Uracil-) Reihe andersartige, obgleich ebenfalls auf Wasserstoffbindungen beruhende Konfigurationen angetroffen wurden¹³⁻¹⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen zwischen den Purin- und Pyrimidinbasen von Nukleosiden in einem chromatographischen System untersucht und zu Nukleosid-Trennungen verwertet. Besonderes Interesse galt der Frage, inwieweit an den chromatographischen Trenneffekten Wasserstoffbindungen zwischen komplementären Basen beteiligt sind.

Material und Methoden

Amberlite-CG 50-Hydrazid. Amberlite-CG 50/II (Serva Entwicklungslabor, Heidelberg) wurde nach den Angaben von *Grubhofer* und *Schleith*¹⁶ gereinigt, getrocknet und zur Umwandlung seiner Carboxyl- in Säurechloridgruppen mit Thionylchlorid und Pyridin 4 Tage unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Einer Chloridbestimmung¹⁷ zufolge wurden dabei 90% der Carboxylgruppen des Amberlite in die Säurechloridform übergeführt. Das mit absol. Toluol gewaschene und von Lösungsmittel befreite Harz (19 g) wurde sodann vorsichtig mit wasserfreiem Hydrazin (100 g) übergossen und nach Beendigung der anfänglich sehr heftigen Reaktion unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit 24 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Das Amberlite-CG 50-Hydrazid wurde nach Abfiltrieren und Waschen mit Wasser im Exsikkator über konz. Schwefelsäure getrocknet. Aus dem Ergebnis einer Stickstoffbestimmung nach *Dumas* (N 23,73%) ging hervor, daß 92% der Carboxylgruppen des Austauscherharzes in Säurehydrazidgruppen verwandelt worden waren.

„*Adenosin-Amberlite*“. Für die Umwandlung von Adenosin in Adenin-N⁹-hydroxymethyl-diglykolaldehyd und für dessen Bindung an Amberlite-CG 50-Hydrazid kamen die Methoden von *Khym* und *Cohn*¹⁸ und *Zachau et al.*¹⁹ in modifizierter Form zur Anwendung. Adenosin (1,25 g) wurde in 0,1 m-Essigsäure—Natriumacetat-Puffer, pH 3,8 (110 ml), gelöst, mit 0,1 m-Natriumperjodat-Lösung (62,5 ml) versetzt und 20 Min. bei Raumtemp. stehen gelassen. Zur Reduktion des dabei entstandenen Jodats wurden je 50 ml m-Natriumthiosulfatlösung und n-Essigsäure hinzugefügt. Brachte man nun Amberlite-Hydrazid (3,05 g) in die Lösung ein und rührte sie bei Zimmertemp., so ließ sich der Verlauf der Chemisorption des Adeninderivats durch Messung der Extinktionsabnahme der Lösung bei 260 m μ einfach verfolgen. Nach 3½ Stdn. waren 90% des Purins vom Amberlite-Hydrazid aufgenommen und 15,2% der Säurehydrazidgruppen mit Adeninresten besetzt. Der „Adeno-

¹³ *K. Hoogsteen*, Acta Crystallogr. [Kopenhagen] **12**, 822 (1959); *ibid.* **16**, 907 (1963).

¹⁴ *A. E. V. Haschemeyer* und *H. M. Sobell*, Proc. Natl. Acad. Sci. **50**, 872 (1963).

¹⁵ *F. S. Mathews* und *A. Rich*, J. Molec. Biol. **8**, 89 (1964).

¹⁶ *N. Grubhofer* und *L. Schleith*, Z. physiol. Chem. **296**, 262 (1954).

¹⁷ *G. Jander* und *K. F. Jahr*, Maßanalyse II (Walter de Gruyter & Co.), Sammlung Göschen, Band 1002, Berlin 1943, S. 50.

¹⁸ *J. X. Khym* und *W. E. Cohn*, J. Amer. Chem. Soc. **82**, 6380 (1960).

¹⁹ *H. G. Zachau*, *M. Tada*, *W. B. Lawson* und *M. Schweiger*, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **53**, 221 (1961).

sin-Amberlite“ wurde abfiltriert, mit 0,1*m*-Essigsäure—Natriumacetat-Puffer pH 3,8, dann mit 0,24*m*-Natriumkakodylat-Puffer, pH 6,8 (0,2*m* hinsichtlich der Na^+ -Konzentration), schließlich mit 0,01*m*-Natriumkakodylat-Puffer, dessen Na^+ -Konzentration durch Zugabe von NaCl auf 0,2*m* gebracht worden war, gewaschen und in letzterem Puffer bei 4° C aufbewahrt.

„Uridin-Amberlite“ wurde auf analoge Weise aus perjodat-oxydiertem Uridin und Amberlite-Hydrazid dargestellt; dabei reagierten 14,9% der Säurehydrazidgruppen des Harzes mit dem Dialdehyd-derivat des Uracils.

„Guanosin-Amberlite“. Wegen der geringen Löslichkeit des Guanosins bei Raumtemp. mußte von diesem Nukleosid vor seiner Oxydation mit Perjodat eine übersättigte Lösung hergestellt werden. Guanosin (1,25 g) wurde mit 0,1*m*-Essigsäure—Natriumacetat-Puffer, pH 3,8 (150 ml), erwärmt, bis vollständige Lösung eingetreten war, sodann mit Eiswasser rasch auf Zimmertemp. abgekühlt und sofort mit 0,1*n*- NaJO_4 (62,5 ml) versetzt. Die weiteren Schritte waren die gleichen wie bei der Herstellung von „Adenosin-“ und „Uridin-Amberlite“. 14,5% der Säurehydrazidgruppen des Harzes nahmen unter Hydrazonbildung das Dialdehyd-derivat des Guanosins auf.

Säulenchromatographie. Als Chromatographierohre dienten mit Kühlmantel versehene Glaskapillaren (3 mm Ø, 86 cm lang), deren unteres Ende zu einer Spitze ausgezogen war. In diese Rohre wurden die Nukleosid-Amberlite bzw. Amberlite-Hydrazid, in 0,01*m*-Kakodylatpuffer pH 6,8 (0,2*m* Na^+) gequollen und im gleichen Puffer aufgeschlämmt, eingefüllt; eine dichte Packung des Harzes wurde durch abwechselndes Klopfen der Säule und vorsichtiges Saugen am unteren Rohrende mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe erreicht. Die Füllhöhe der Säulen betrug 82 cm. Eine dem Kühlmantel durchströmende Kühlflüssigkeit hielt die Temperatur konstant auf 5° C.

Die für eine chromatographische Trennung eingesetzte Substanzmenge betrug je Nukleosid 0,04 mg. Die Nukleoside wurden, in insgesamt 0,04 ml 0,01*m*-Kakodylatpuffer pH 6,8 (0,2*m* Na^+) gelöst, auf die Säule aufgebracht und mit demselben Puffer entwickelt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 0,25 ml/Stde. Das Eluat wurde in 0,25 ml-Fraktionen gesammelt, deren genaues Volumen durch Wägung und deren Nukleosidgehalt durch Messung der Extinktionswerte bei 260 und 280 $\text{m}\mu$ in einem Beckman DU Spektralphotometer unter Verwendung von Mikroküvetten ermittelt.

Als ein von den Dimensionen der Chromatographiesäulen unabhängiges Maß für die Retention der Nukleoside wurde der *R*-Wert nach *Le Rosen*²⁰

$$R = \frac{t_M}{t_M + t_A}$$

herangezogen; t_M bedeutet die Zeit, in der sich die Moleküle im Mittel in der mobilen Phase aufzuhalten, t_A die Zeit, in der sie an der stationären Phase adsorbiert sind. Da das Produkt aus t_M und der Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase gleich dem Durchbruchsvolumen V_0 einer nicht adsorbierten Substanz und damit gleich dem Volumen der mobilen Phase in der mit Harz gefüllten Säule und da das Produkt aus ($t_M + t_A$) und der Strömungsgeschwindigkeit gleich dem Elutionsvolumen V_E einer adsorbierbaren Substanz ist, ist *R* gleichbedeutend mit V_0/V_E . Je stärker die Retention

²⁰ *A. L. Le Rosen*, *J. Amer. Chem. Soc.* **64**, 1905 (1942); *ibid.* **67**, 1683 (1945).

einer Substanz am Säulenmaterial ist, desto mehr weicht ihr *R*-Wert von 1,00 nach unten ab.

Zur Ermittlung von V_0 wurden auf die mit Amberlite-Hydrazid gefüllte Chromatographiesäule 0,08 mg NaF in 0,04 ml Kakodylatpuffer aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. In einem zweiten Versuch kam als Elutionsmittel eine mit Kakodylat gepufferte 7*m*-Harnstofflösung zur Anwendung. Das Auftreten des Fluorids im Eluat ließ sich an der Entfärbung eines Zirkon-Alizarin S-Komplexes erkennen²¹. Die Durchbruchsvolumina waren bei Einsatz beider Elutionsmittel innerhalb der Fehlergrenze gleich.

Für die Untersuchung des Einflusses von Harnstoff auf die Retention der Nukleoside am Säulenmaterial wurde sowohl zur Vorbehandlung des Amberlite vor dem Einfüllen in das Chromatographierohr als auch zur Entwicklung der Chromatogramme ein 0,01*m*-Kakodylatpuffer, pH 6,8 (0,2*m* Na⁺) verwendet, dem Harnstoff bis zu einer Konzentration von 7*m* zugesetzt worden war.

Identifizierung der Nukleoside. Die in den Eluatfraktionen vorhandenen Nukleoside wurden direkt durch das für sie charakteristische Verhältnis der Extinktionen bei 280 und 260 m μ ²² und nach Adsorption an Aktivkohle und Desorption mit Pyridin-Wasser (2:8, *v/v*)²³ papierchromatographisch identifiziert. Zu diesem Zweck ließ man sie auf dem Chromatographiepapier Schleicher & Schüll 2043a absteigend mit Isopropylalkohol-HCl (170 ml Isopropylalkohol, 41 ml konz. HCl und Wasser ad 250 ml) oder aufsteigend mit *n*-Butanol-Wasser-konz. NH₄OH (86:14:1, *v/v/v*) laufen²⁴ und bediente sich zu ihrer Lokalisierung der von ihnen bei Bestrahlen der Chromatogramme mit kurzwelligem Ultravioletlicht (Analysenlampe Hanau, 254 m μ) verursachten Fluoreszenzlöschung²⁴.

Ergebnisse

Für die kovalente Verknüpfung von Nukleinsäurebasen mit einem für chromatographische Versuche als stationäre Phase geeigneten Trägermaterial zogen wir die Hydrazonbildung zwischen Polyacrylsäurehydrazid (Amberlite-CG 50-Hydrazid) und Purin- bzw. Pyrimidin-hydroxymethyl-diglykolaldehyden, die aus Nukleosiden bei der Oxydation mit Perjodat entstehen¹⁸, heran. Als Vorbild diente die von *Zachau*¹⁹ beschriebene Anlagerung von Aminosäureakzeptor-Ribonukleinsäure, in deren terminale Nukleosidgruppierung durch Behandeln mit Perjodat Aldehydfunktionen eingeführt worden waren, an das Hydrazid-Harz Lewatit 5082 S. Die Darstellung des Amberlite-Hydrazids erfolgte dadurch, daß die Carboxylgruppen von Amberlite-CG 50 zunächst in Säure-

²¹ *F. Feigl*, „Qualitative Analysis by Spot Tests“, Elsevier Publ. Co., New York-Amsterdam, 3. Aufl., 1947, S. 202.

²² *G. H. Beaven, E. R. Holiday und E. A. Johnson*, in „The Nucleic Acids“ (*E. Chargaff and J. N. Davidson*, eds.), Acad. Press, New York 1955, Vol. 1, S. 495f.

²³ *R. B. Hurlbert*, in „Methods in Enzymology“ (*S. P. Colowick and N. O. Kaplan*, eds.), New York 1957, Vol. 3, S. 793.

²⁴ *G. R. Wyatt*, in „The Nucleic Acids“ (*E. Chargaff and J. N. Davidson*, eds.), Acad. Press, New York 1955, Vol. 1, S. 246, 252.

chlorid- und dann durch Behandlung mit wasserfreiem Hydrazin in Säurehydrazidgruppen verwandelt wurden. Bei der Umsetzung mit perjodat-oxydierten Nukleosiden wurden unter den von uns gewählten

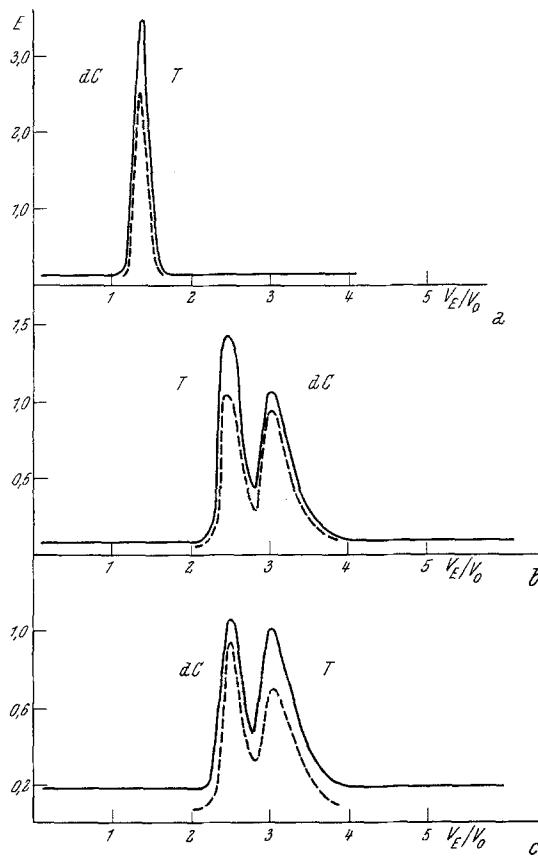


Abb. 1. Säulenchromatographie von Thymidin (T) und Deoxycytidin (dC) an

- a) Amberlite-Hydrazid,
- b) „Guanosin-Amberlite“ und
- c) „Adenosin-Amberlite“.

Ordinate: Extinktion der Eluatfraktionen bei 260 (—) und 280 (---) m μ .
 Abszisse: Elutionsvolumen (V_E) in Vielfachen des Flüssigkeitsvolumens (V_0) der mit Harz gefüllten Säule.

Bedingungen an ca. 15% der Hydrazidgruppen Purin- oder Pyrimidinbasen kovalent gebunden. Die so erhaltenen Harze werden im folgenden kurz „Nukleosid-Amberlite“ genannt.

Amberlite-Hydrazid selbst tritt mit Pyrimidin-nukleosiden in eine verhältnismäßig schwache Wechselwirkung (Abb. 1a und 3a): Bei der Chromatographie von Deoxycytidin (dC) oder Cytidin (C) an Amberlite-

Hydrazid betrug der *R*-Wert etwa 0,76; für Thymidin (*T*) und Uridin (*U*) ergaben sich *R*-Werte von 0,74 bzw. 0,70.

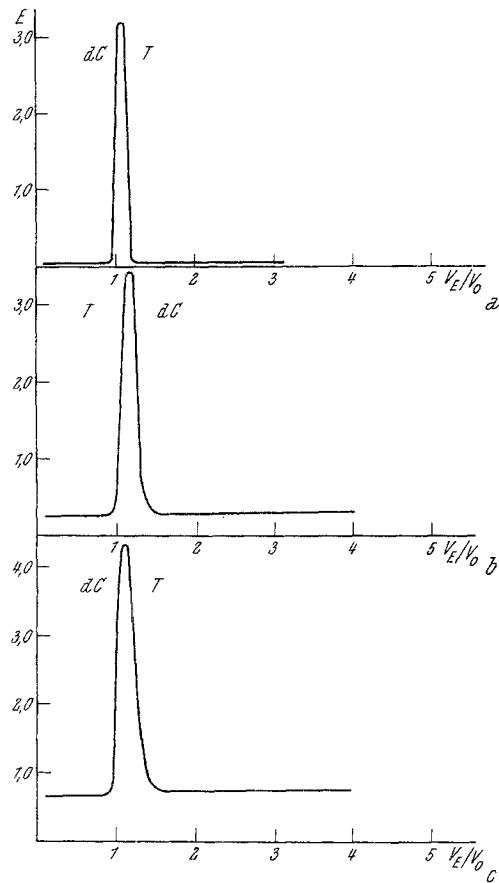


Abb. 2.

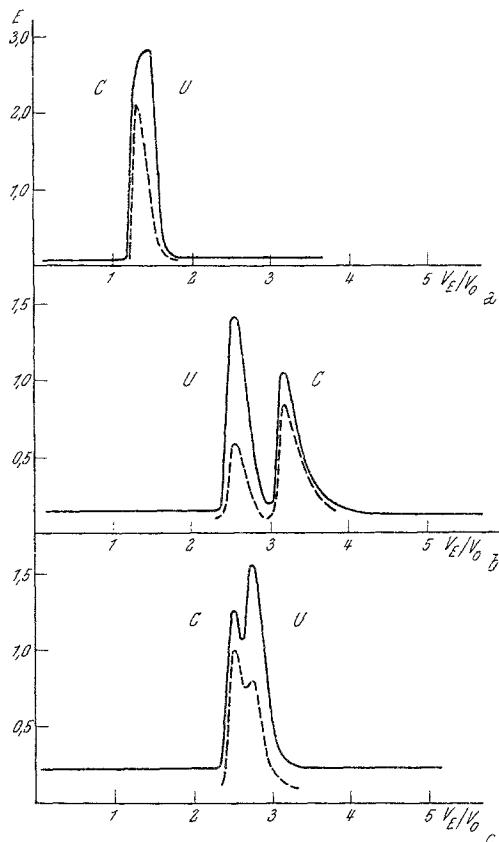


Abb. 3.

Abb. 2. Säulenchromatographie von Thymidin (*T*) und Deoxycytidin (*dC*) in 7*m*-Harnstofflösung an

- a Amberlite-Hydracid,
 - b „Guanosin-Amberlite“ und
 - c „Adenosin-Amberlite“.
- Koordinaten wie in Abb. 1.

Abb. 3. Säulenchromatographie von Uridin (*U*) und Cytidin (*C*) an

- a Amberlite-Hydracid,
 - b „Guanosin-Amberlite“ und
 - c „Adenosin-Amberlite“.
- Koordinaten wie in Abb. 1.

Wenn eine Mischung von *dC* und *T* bei 5°C und pH 6,8 durch eine mit Amberlite-Hydracid gefüllte Säule geschickt wurde, kam es daher zu keiner Trennung der beiden Deoxyribonukleoside (Abb. 1a); nur

aus dem Abfall des Extinktionsverhältnisses E_{280}/E_{260} in aufeinanderfolgenden nukleosidhaltigen Eluatfraktionen ging hervor, daß T (mit R 0,74) gegenüber dC (R 0,76) geringfügig retardiert worden war. Bei

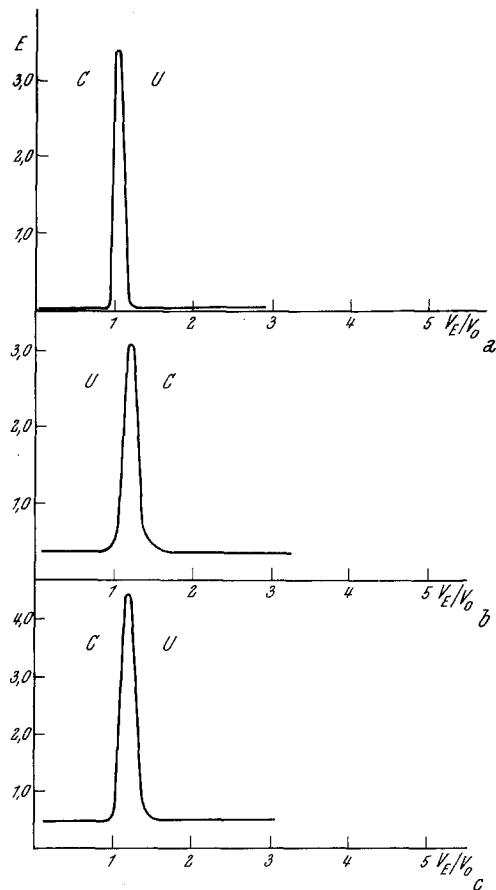


Abb. 4. Säulenchromatographie von Uridin (U) und Cytidin (C) in 7m-Harnstofflösung an
 a Amberlite-Hydrazid,
 b „Guanosin-Amberlite“ und
 c „Adenosin-Amberlite“. Koordinaten wie in Abb. 1.

Chromatographie an „Guanosin-Amberlite“ (Abb. 1 b) war die Elution beider Deoxyribonukleoside beträchtlich verzögert, wobei jedoch dC (mit R 0,34) bedeutend stärker als T (mit R 0,42) retardiert wurde. Mit „Adenosin-Amberlite“ als Säulenfüllung (Abb. 1 c) kehrte sich die Reihenfolge, in der dC und T eluiert wurden, um; nun hielt das Säulenmaterial T (mit R 0,34) stärker zurück als dC (R 0,41).

Das Elutionsverhalten der Ribonukleoside Cytidin und Uridin war jenem der Deoxy-ribonukleoside *dC* und *T* sehr ähnlich. „Guanosin-

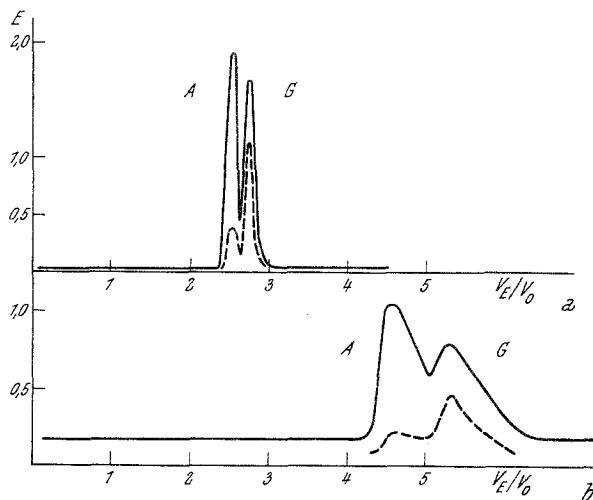


Abb. 5. Säulenchromatographie von Adenosin (A) und Guanosin (G) an
a Amberlite-Hydracid und
b „Uridin-Amberlite“. Koordinaten wie in Abb. 1.

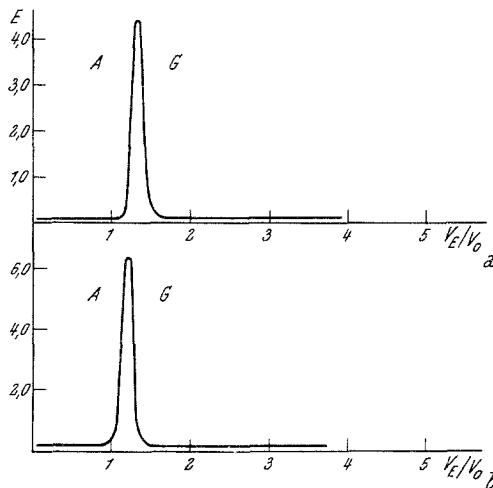


Abb. 6. Säulenchromatographie von Adenosin (A) und Guanosin (G) in 7m-Harnstofflösung an
a Amberlite-Hydracid und
b „Uridin-Amberlite“. Koordinaten wie in Abb. 1.

Amberlite“ hielt das ihm komplementäre *C* (*R* 0,32) stärker als *U* (*R* 0,40) und „Adenosin-Amberlite“ das ihm komplementäre *U* (*R* 0,37) stärker als *C* (*R* 0,40) zurück (Abb. 3). Die Trennung von *U* und *C* an „Adenosin-

Amberlite“ (Abb. 3c) war jedoch nicht so ausgeprägt wie jene von *T* und *dC* (Abb. 1c), weil die Wechselwirkung des an Amberlite fixierten Adenosins mit *U* weniger stark war als mit *T*.

Bei der Chromatographie der Purinnukleoside Adenosin (*A*) und Guanosin (*G*) an Amberlite-Hydrazid und „Uridin-Amberlite“ (Abb. 5) traten wesentlich größere Retentionen in Erscheinung als bei der Chromatographie der Pyrimidinnukleoside. „Uridin-Amberlite“ retardierte unerwarteterweise *G* (*R* 0,19) stärker als *A* (*R* 0,22). Aber auch an Amberlite-Hydrazid kam es zu einer sukzessiven Elution und deutlichen Trennung von *A* (*R* 0,40) und *G* (*R* 0,33).

Die Verwendung von 7*m*-Harnstoff als Elutionsmittel bei der Chromatographie der Pyrimidin- und Purinnukleoside brachte alle Trenneffekte zum Verschwinden (Abb. 2, 4 und 6). Unabhängig von der Art des Säulenmaterials und der Natur der Nukleoside traten keine wesentlichen retardierenden Wechselwirkungen mehr auf; die *R*-Werte der Nukleoside stiegen bis in die Nähe von 1.

Diskussion

Eine kovalente Bindung von Nukleinsäurebasen an ein chromatographisches Trägermaterial mit dem Ziel, paarweise Wechselwirkungen zwischen Basen für Trennungen auszunützen, ist schon von anderen Autoren beschrieben worden^{25, 26}. Während in den Nukleinsäuren eine glykosidische Verknüpfung der Purin- und Pyrimidinbasen über deren Ring-Stickstoffatome N⁹ bzw. N¹ vorliegt, führten die bisherigen Bemühungen, die Basen an Träger anzuheften, jedoch zu andersartigen Substitutionen, die die Elektronenverteilung in den heterocyclischen Systemen und deren Fähigkeit zu spezifischen Wechselwirkungen verändern mußten. Die von uns benützte Methode zur Knüpfung kovalenter Bindungen zwischen perjodat-oxydierten Nukleosiden und Polyacrylsäurehydrazid zieht das Purin- und Pyrimidin-Ringsystem nicht in Mitleidenschaft.

Bei der Chromatographie der Pyrimidinnukleoside *T*, *dC*, *C* und *U* an nicht substituiertem Amberlite-Hydrazid (Abb. 1a und 3a) wurden schwache und voneinander nur wenig abweichende Retentionen beobachtet (*R* 0,70 bis 0,76). Kräftigere Wechselwirkungen mit dem Harz zeigten die Purinnukleoside *A* und *G* (*R* 0,40 bzw. 0,33, Abb. 5a). Die stärkere Retardierung der Purine im Vergleich zu jener der Pyrimidine, die schon früher an Kationenaustauschersäulen festgestellt worden ist²⁷,

²⁵ A. S. Jones und D. G. Parsons, Proc. Chem. Soc. [London] **1961**, 78.

²⁶ L. Bosch, G. Wende und H. Bloemendaal, Nature [London] **191**, 349 (1961).

²⁷ W. E. Cohn, in „The Nucleic Acids“ (E. Chargaff and J. N. Davidson, eds.), Acad. Press, New York 1955, Vol. 1, S. 218.

läßt sich durch die höhere Polarisierbarkeit der Purine erklären. Da alle Retentionen in 7m-Harnstofflösung ausblieben, ist eine Beteiligung von Ionenaustausch-Effekten auszuschließen.

Wenn man von der Voraussetzung ausgeht, daß die Wechselwirkungen zwischen jenen Basen, die im Watson—Crick'schen DNA-Modell miteinander gepaart sind, auch in einem einfachen chromatographischen System stärker sind als die Wechselwirkungen zwischen anderen Basen, sollte man erwarten, daß bei der Nukleosid-Chromatographie an „Guanosin-Amberlite“ das *dC*, an „Adenosin-Amberlite“ das *T* besonders kräftig zurückgehalten wird. Diese Erwartung hat sich erfüllt.

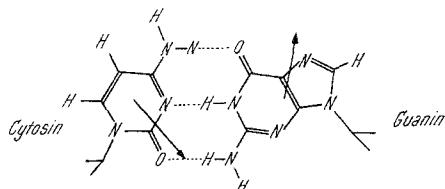


Abb. 7.

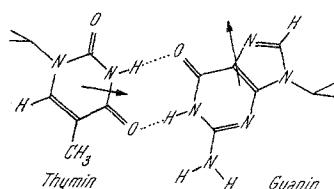


Abb. 8.

Abb. 7. Das Guanin—Cytosin-Paar² nach Pauling und Corey³. Die Pfeile stellen die Vektoren der Gesamtdipolmomente nach De Voe und Tinoco²⁸ dar.

Abb. 8. Paarung von Thymin und Guanin unter Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken. Die Pfeile stellen wiederum die Vektoren der Gesamtdipolmomente dar.

An „Guanosin-Amberlite“ wurden sowohl *dC* als auch *T* bedeutend stärker retardiert als an Amberlite-Hydrazid (Abb. 1 a, b), wobei die Retention des *dC* (*R* 0,34) beträchtlich größer war als die des *T* (*R* 0,42). Die große Affinität des *dC* zu den Guaninresten am Harz steht in Übereinstimmung damit, daß Guanin und Cytosin miteinander sowohl in der Watson—Crick'schen DNA-Struktur² als auch in Mischkristallen^{10—12} gepaart sind und einen Komplex bilden, der durch *drei* Wasserstoffbrücken besonders stabilisiert ist³ (Abb. 7). Die Pfeile in der Abb. stellen die Vektoren der Gesamtdipolmomente nach De Voe und Tinoco²⁸ dar. Da die Dipolmomente des Cytosins (8,0 *D*) und des Guanins (6,9 *D*) groß sind, leistet vermutlich auch die Dipolwechselwirkung zwischen diesen Basen einen Beitrag zu Bindungsenergie. An Hand von Kalottenmodellen läßt sich zeigen, daß intramolekulare Wasserstoffbindungen, die z. B. zwischen der 5'-OH-Gruppe der Ribose und der C²=O-Gruppe des Cytosins möglich sind²⁹, die Basenpaarbildung sterisch nicht beeinflussen; durch die Inanspruchnahme eines Elektronenpaares der C²=O-Gruppe könnte allenfalls die Stärke der intermolekularen H-Bindung herabgesetzt werden.

²⁸ H. De Voe und I. Tinoco, J. Molec. Biol. **4**, 505 (1962).

²⁹ J. Pitha, S. Chládek und J. Smrt, Coll. Czech. Chem. Comm. **28**, 1622 (1963).

Die Retention des *T* an „Guanosin-Amberlite“ läßt sich ebenfalls durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken erklären. Während in der doppelstrangigen *DNA* aus räumlichen Gründen eine Komplexbildung zwischen den in ihrer Lage weitgehend fixierten Thymin- und Guaninresten ausgeschlossen ist, kann im chromatographischen System das frei bewegliche *T* mit dem an Harz gebundenen *G* zwei Wasserstoffbindungen eingehen. Es sind mehrere *T*—*G*-Paare unter Beteiligung verschiedener funktioneller Gruppen an den zwei H-Brücken denkbar; der in Abb. 8 wiedergegebene Komplex dürfte jedoch gegenüber anderen aus sterischen Gründen und wegen der Beteiligung der relativ aziden N¹—H-Gruppe des Guanins energetisch bevorzugt sein³⁰.

An „Adenosin-Amberlite“ wurde *T* stärker als *dC* zurückgehalten (Abb. 1c). Darin könnte man zunächst eine Bestätigung für die Annahme sehen, daß die „komplementären“ Basen Adenin und Thymin auch außerhalb der *DNA*-Doppelhelix eine besondere Tendenz zur Paarung zeigen. Es ist jedoch einzuwenden, daß infolge der freien Beweglichkeit der Nukleoside im chromatographischen System sowohl *T* als auch *dC* imstande sind, mit dem am Harz immobilisierten Adenin Komplexe zu bilden; in beiden Fällen werden sich an der Paarung *zwei* Wasserstoffbindungen beteiligen können (Abb. 9 und 10). Zur Erklärung der unterschiedlichen Retentionen muß man die verschiedene Stärke dieser Bindungen heranziehen. Eine der beiden Wasserstoffbrücken des *A*—*T*-Paars ist infolge der Mitwirkung der verhältnismäßig aziden N³—H-Gruppe des Thymins besonders stabil³⁰; im *A*—*C*-Paar hingegen gehen beide Wasserstoffbindungen von weniger aziden NH₂-Gruppen aus und ergeben eine geringere Bindungsenergie.

Auch Unterschiede der Entropie mögen das Adenin—Thymin-Paar gegenüber dem Adenin—Cytosin-Paar bevorzugen. Abgesehen von dem in Abb. 9 dargestellten und in der *DNA*-Doppelhelix vorkommenden Komplex sind noch drei andere, ähnliche H-gebundene Anordnungen des Adenins und Thymins möglich. Eine von ihnen ist von *Hoogsteen*¹³ bei der Untersuchung von Mischkristallen aus 9-Methyladenin und 1-Methylthymin angetroffen worden, eine andere kommt nach *Haschemeyer* und *Sobell*¹⁴ bei der Co-Kristallisation von Adenosin und 5-Bromuridin zustande. Da es für Adenin/Thymin eine größere Anzahl energetisch etwa gleichwertiger Anordnungsmöglichkeiten gibt als für Adenin/Cytosin, ist die Bindung des Thymins an Adenin entropisch begünstigt.

Die Annahme, daß nur Dipol—Dipol- und dipolinduzierte Dipol-Wechselwirkungen sowie Dispersionskräfte für die Basenpaarung ver-

³⁰ H. A. Staab, „Einführung in die theoretische organische Chemie“, Verlag Chemie, Weinheim 1960, S. 680.

antwortlich seien²⁸, ist mit dem Befund, daß an der „Adenosin-Amberlite“-Säule *T* stärker als *dC* retardiert wird, nicht vereinbar; denn die Polarisierbarkeit von Thymin und Cytosin ist etwa gleich groß und das Dipolmoment des Cytosins sogar größer ($8,0\text{ D}$) als jenes von Thymin ($3,5\text{ D}$)²⁸.

Das bei den chromatographischen Versuchen festgestellte ähnliche Verhalten der Pyrimidin-Ribonukleoside und -Deoxyribonukleoside zeigt, daß eine zusätzliche Hydroxylgruppe im Zuckeranteil die Wechselwirkungen der Nukleoside mit den „Nukleosid-Amberlite“-Harzen kaum beeinflußt (Abb. 1 und 3). Wenn an „Adenosin-Amberlite“ *T* (*R* 0,34) etwas stärker als *U* (*R* 0,37) zurückgehalten wurde, ist dafür nicht der Unterschied im Zuckerrest verantwortlich zu machen, sondern

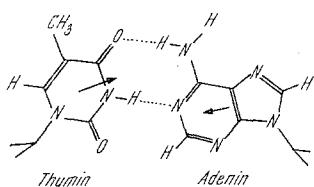


Abb. 9

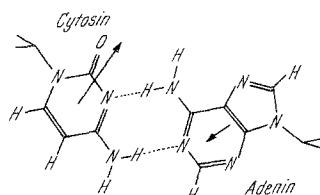


Abb. 10

Abb. 9. Das Adenin—Thymin-Paar nach Watson und Crick²

Abb. 10. Paarung von Adenin und Cytosin unter Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken.

vermutlich die C⁵-Methylgruppe des Thymins, die durch Erhöhung der Elektronendichte im Pyrimidinringssystem die Wasserstoffbindung stabilisiert, die sich zwischen der C⁴=O-Gruppe des Thymins und der Aminogruppe des Adenins ausbilden kann. In guter Übereinstimmung damit steht der Befund, daß Polythymidylsäure—Polyadenylsäure-Doppelhelices um einige Grade höher schmelzen als Polyuridylsäure—Polyadenylsäure-Doppelhelices³¹.

Wenn sich in unserem chromatographischen System Purinnukleoside in der mobilen Phase befanden, traten zwischen ihnen und der statioären Phase verhältnismäßig starke Wechselwirkungen auf. Ein Gemisch von *A* (*R* 0,40) und *G* (*R* 0,33) wurde schon an Amberlite-Hydrazid getrennt (Abb. 5a). Chromatographierte man das Gemisch an „Uridin-Amberlite“ (Abb. 5b), so wurde entgegen der in der *DNA* waltenden Basenkomplementarität *G* (*R* 0,19) stärker zurückgehalten als *A* (*R* 0,22). Auch dieser Effekt läßt sich auf Grund der größeren Bindungsenergie des *G*—*U*-Paars infolge der Beteiligung zweier azider N—H-Gruppen gegenüber nur einer im *A*—*U*-Paar erklären. In Widerspruch dazu steht der Befund, daß Uridin an „Guanosin-Amberlite“ etwas schwächer retardiert wird (*R* 0,40) als an „Adenosin-Amberlite“ (*R* 0,37)

³¹ D. Shugar und W. Szer, J. Molec. Biol. 5, 580 (1962).

(Abb. 3 b, c); dies könnte jedoch auf die geringere Kapazität des „Guanosin-Amberlite“ (14,5% der Hydrazidgruppen substituiert) im Vergleich zu der des „Adenosin-Amberlite“ (15,2%) zurückzuführen sein.

Harnstoff in hoher Konzentration hob die Nukleosid-Trennungen an Amberlite-Hydrazid und an den „Nukleosid-Amberlite“-Harzen auf (Abb. 2, 4 und 6). Alle untersuchten Nukleoside erreichten bei der Chromatographie in Gegenwart von 7*m*-Harnstoff an allen Harzen *R*-Werte in der Nähe von 1. Das Wegfallen der Wechselwirkungen zwischen den Nukleosiden und den homöopolar an das Harz gebundenen Nuklein-säurebasen läßt sich am besten durch die Annahme erklären, daß sich in konz. Harnstofflösung keine durch Wasserstoffbrücken gebundenen Basenpaare mehr ausbilden können³².

³² H. Tuppy und E. Küchler, Mh. Chem. **95**, 1691 (1964).