

Wechselwirkungen zwischen Purin- und Pyrimidinbasen von Nukleosiden in einem chromatographischen System, 2. Mitt.¹:

Nachweis der Beteiligung von Wasserstoffbindungen

Von

H. Tuppy und E. Küchler

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 30. September 1964)

Um über die Art der Wechselwirkungen zwischen komplementären Purin- und Pyrimidinbasen in dem früher beschriebenen chromatographischen System^{1, 2} näheren Aufschluß zu erhalten, wurde untersucht, welche Auswirkung auf die Retention eines Nukleosids die Methylsubstitution eines jener Wasserstoffatome hat, die nach Watson und Crick in den Basenpaaren der Deoxyribonukleinsäure an Wasserstoffbindungen beteiligt sind. Bei der Säulenchromatographie eines Nukleosids und seines Methyl-derivats (Uridin-3-Methyluridin oder Adenosin-Dimethyladenosin) an einem Harz, das die komplementäre Base kovalent gebunden trug (Adenosin- bzw. Uridin-Amberlite), wurde das alkylierte Nukleosid jeweils schwächer retardiert. Dadurch ist erwiesen, daß die Retention der Nukleoside vor allem auf Wasserstoffbindungen zwischen komplementären Basen beruht. Die Verwendung von 7m-Harnstofflösung als Eluens wirkte sich bei der Chromatographie der Nukleoside in gleicher Weise wie deren Methylierung retentionsvermindernd aus; daraus geht hervor, daß Harnstoff in diesem System ein H-Bindungen spaltendes Agens darstellt.

The interactions of purine and pyrimidine bases in the previously described chromatographic system^{1, 2} are mainly due to hydrogen bonding. This conclusion was drawn from a comparison of the chromatographic behaviour of nucleosides with that of

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

² *H. Tuppy und E. Küchler*, Mh. Chem. **95**, 1677 (1964).

their alkyl derivatives which, as a result of the replacement of an H atom in the nucleoside bases by a methyl group, are unable to participate in the formation of H-bridged complexes of the type which *Watson* and *Crick* have shown to occur in DNA. Thus, 3-methyluridine was less retarded than uridine on a column of "Adenosine-Amberlite", and dimethyladenosine was less retarded than adenosine on "Uridine-Amberlite". The use of 7*m*-urea as an eluent in the chromatography of the nucleosides resulted in a similar decrease of retention as the prevention of H bonding of the nucleosides by methylation, suggesting that urea is effective in this system as an H bond-cleaving agent.

In der ersten Mitteilung² wurde über ein chromatographisches System berichtet, das eine Trennung von Nukleosiden auf Grund der Wechselwirkungen zwischen komplementären Purin- und Pyrimidinbasen erlaubt. An Säulen aus einem Harz, an das Nukleinsäurebasen homöopolar gebunden waren, wurden in wässriger Pufferlösung Nukleoside chromatographiert und die Elutionsvolumina bestimmt. Zur Erklärung der dabei auftretenden Retentionen wurde angenommen, daß sich zwischen den frei beweglichen Nukleosiden und den am Harz fixierten Basen intermolekulare Komplexe ausbilden, die den Basenpaaren^{3, 4} in der Deoxyribonukleinsäure und in homogenen Mischkristallen von Purin- und Pyrimidinderivaten entsprechen⁵⁻¹⁰. Wurde 7*m*-Harnstofflösung als Elutionsmittel verwendet, so traten praktisch keine Trenneffekte mehr auf.

Um zu beweisen, daß an den in der ersten Mitteilung² beschriebenen Retentionen tatsächlich durch intermolekulare Wasserstoffbrücken gebundene Basenpaare beteiligt sind, wurden die Elutionsvolumina alkylierter Nukleoside bestimmt, bei denen Wasserstoffatome, die in den Basenpaaren der *DNA*-Doppelhelix Wasserstoffbindungen bilden, durch Methylgruppen ersetzt waren. Wenn die bei der Chromatographie der Nukleoside beobachteten Retentionen durch Wasserstoffbindungen zwischen ihnen und den am Harz fixierten Basen zustande kommen, muß man für die alkylierten Nukleoside kleinere Durchbruchsvolumina als für die entsprechenden nicht alkylierten erwarten. Dagegen sollte

³ *J. D. Watson* und *F. H. C. Crick*, *Nature* [London] **171**, 737, 964 (1953).

⁴ *L. Pauling* und *R. B. Corey*, *Arch. Biochem. Biophysics* **65**, 164 (1956).

⁵ *E. J. O'Brien*, *J. Molec. Biol.* **7**, 107 (1963).

⁶ *H. M. Sobell*, *K. Tomita* und *A. Rich*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **49**, 885 (1963).

⁷ *A. E. V. Haschemeyer* und *H. M. Sobell*, *Nature* [London] **202**, 969 (1964).

⁸ *K. Hoogsteen*, *Acta Crystallogr.* [Kopenhagen] **12**, 822 (1959); *ibid.* **16**, 907 (1963).

⁹ *A. E. V. Haschemeyer* und *H. M. Sobell*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **50**, 872 (1963).

¹⁰ *F. S. Mathews* und *A. Rich*, *J. Molec. Biol.* **8**, 89 (1964).

bei Überwiegen von Dipol—Dipol-Kräften die Veränderung des Elutionsvolumens mit der Änderung des Dipolmoments parallel gehen. In dem Falle, daß vor allem Dispersionskräfte für die Wechselwirkungen verantwortlich sind, sollte man eine etwas stärkere Retention des alkylierten Nukleosids beobachten, da die zusätzliche Methylgruppe dessen Polarisierbarkeit vergrößert.

Material und Methoden

Zur Fixierung der Nukleinsäurebasen an einem unlöslichen Trägermaterial wurden, wie in der 1. Mitt.² beschrieben, die Nukleoside zu den Dialdehyden oxydiert¹¹ und an Amberlite-CG 50-hydrazid² unter Hydrazonbildung kovalent gebunden („Nukleosid-Amberlite“). Beim „Adenosin-Amberlite“ waren 15,2% der Hydrazidgruppen mit dem Adeninderivat besetzt, beim „Uridin-Amberlite“ 14,9%.

Die Synthese von 3-Methyluridin erfolgte nach der Vorschrift von Miles¹² durch Methylierung von Uridin mit CH_2N_2 . Das aus einem Ansatz von 2 g Uridin zunächst als Öl erhaltene Produkt wurde zur weiteren Reinigung an einer Cellulosesäule (4 cm Durchmesser, 60 cm lang) mit dem Lösungsmittelgemisch *n*-Butanol: H_2O : konz. NH_4OH (86:14:1, *v/v/v*) als Eluens chromatographiert. Alle Fraktionen des Eluats, die nach Tüpfeln auf Filterpapier und bei Beobachtung unter der UV-Analysenlampe (Marke Hanau, 254 μm) eine Fluoreszenzlösung zeigten¹³, untersuchten wir papierchromatographisch im Lösungsmittelsystem *n*-Butanol: H_2O (86:14, *v/v*)¹³ auf Schleicher & Schüll Papier Nr. 2043a aufsteigend. Diejenigen, welche 3-Methyluridin (R_f 0,41) ohne wesentliche Verunreinigung enthielten, wurden nach Abdampfen des Lösungsmittels in absol. Methanol aufgenommen und nochmals eingedampft. Das über konz. H_2SO_4 im Hochvak. getrocknete Öl kristallisierte bei 4°C; durch Umkristallisieren aus absol. Methanol:absol. Äthylacetat (1:4, *v/v*) erhielten wir das 3-Methyluridin in Form weißer Kristalle vom Schmp. 120°.

6-Dimethylaminopurin-9-ribosid (Dimethyladenosin) wurde nach der Vorschrift von Kissman¹⁴ durch Reduktion von 2-Mercapto-6-dimethylaminopurin-9-ribosid gewonnen; dieses stellte uns Dr. K. J. M. Andrews, Roche Products Ltd., zur Verfügung.

Die Bedingungen der *Chromatographie der Nukleoside* an dem mit Nukleinsäurebasen beladenen Harz in wäßrigem Kakodylatpuffer und in 7*m*-Harnstofflösung, die Größe der Säule und die Bestimmung der Elutionsvolumina waren dieselben wie vorher². Zur Ermittlung des Nukleosidgehalts der Eluatfraktionen wurde deren Extinktion bei 260 μm in einem Beckman DU Spektralphotometer unter Verwendung von Mikroküvetten gemessen. Bei der chromatographischen Trennung von Dimethyladenosin und Adenosin ließen sich die beiden Nukleoside im Eluat durch die Quotienten ihrer Extink-

¹¹ J. X. Khym und W. E. Cohn, J. Amer. Chem. Soc. **82**, 6380 (1960).

¹² H. T. Miles, Biochim. Biophys. Acta **22**, 248 (1956).

¹³ G. R. Wyatt, in „The Nucleic Acids“ (E. Chargaff und J. N. Davidson, eds.), Acad. Press, New York 1955, Vol. 1, S. 246, 252.

¹⁴ H. M. Kissman, C. Pidacks und B. R. Baker, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 18 (1955).

tionen bei 274 und 260 m μ (1,50 bzw. 0,40) unterscheiden^{15, 16}. Da die Spektren von 3-Methyluridin und Uridin in der Nähe des Neutralpunktes gleich sind, wurde zur Identifizierung dieser Nukleoside den Fraktionen des Eluats zunächst 0,2n-NaOH im Verhältnis 1:1 (v/v) zugesetzt und sodann der Quotient E_{263}/E_{245} m μ bestimmt; dieser betrug für 3-Methyluridin bei pH 13,0 1,96, während für Uridin ein Wert von 1,39 angegeben worden ist¹⁷. Weiters trennten wir die in den Eluatfraktionen befindlichen Nukleoside nach Adsorption an Aktivkohle und Desorption mit Pyridin:Wasser (2:8, v/v)¹⁸ mit dem Lösungsmittelsystem Isopropylalkohol—HCl auf dem Chromatographiepapier Schleicher & Schüll Nr. 2043a (absteigend) und lokalisierten sie durch die Fluoreszenzlösung bei Bestrahlung mit kurzwelligem UV (Analysenlampe, 254 m μ)¹⁹ (Dimethyladenosin, R_f 0,60; 3-Methyluridin, R_f 0,97).

Als vom Volumen der Säule unabhängiges Maß für die Retention wurde wie in der 1. Mitt.² der R -Wert nach *Le Rosen*¹⁹, $R = \frac{V_0}{V_E}$, verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

Als stationäre Phase für die Säulenchromatographie diente wiederum das Harz Amberlite-Hydrazid, das aus dem Kationenaustauscher Amberlite-CG 50/II, einer Polyaacrylsäure, durch Chlorieren und Überführen in das Säurehydrazid gewonnen wurde. Nukleoside wurden zu den Dialdehyden oxydiert und homöopolar unter Hydrazonbildung an Amberlite-Hydrazid gebunden².

Aus den Elutionskurven der Säulenchromatographie von 6-Dimethylaminopurin-9-ribosid (Dimethyladenosin) und Adenosin bzw. von 3-Methyluridin und Uridin an Amberlite-Hydrazid (Abb. 1 a und 3 a) geht hervor, daß Nukleoside und alkylierte Nukleoside voneinander getrennt werden und daß die alkylierten Nukleoside jeweils die kleineren Retentionsvolumina besitzen. Dies weist auf etwas schwächere Wechselwirkungen mit dem Harz hin.

Die Trenneffekte werden wesentlich verstärkt, wenn man die Chromatographie an Amberlite-Hydrazid, das die zum frei beweglichen Nukleosid komplementäre Base kovalent gebunden trägt, wiederholt. So wird an „Uridin-Amberlite“ (Abb. 1 b) Adenosin (R 0,24) bedeutend stärker retardiert als Dimethyladenosin (R 0,30). Ganz analog verhalten sich Uridin und 3-Methyluridin an „Adenosin-Amberlite“ (Abb. 3 b); die

¹⁵ *J. W. Littlefield und D. B. Dunn*, Biochem. J. **70**, 642 (1958).

¹⁶ *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.

¹⁷ *J. J. Fox und D. Shugar*, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **9**, 369 (1952).

¹⁸ *R. B. Hurlbert*, in „Methods in Enzymology“ (*S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.*), New York 1957, Vol. 3, S. 793.

¹⁹ *A. L. Le Rosen*, J. Amer. Chem. Soc. **64**, 1905 (1942); *ibid.* **67**, 1683 (1945).

Retention des Uridins (R 0,38) ist größer als die seines Methyllderivats (R 0,51). Die Methylgruppe, die an Stelle eines Wasserstoffatoms, das

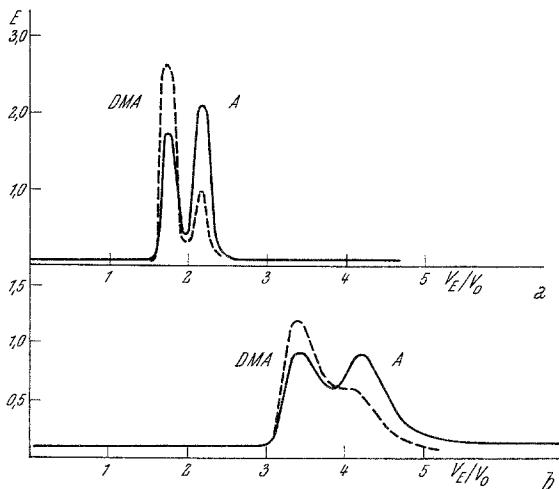


Abb. 1. Säulenchromatographie von Dimethyladenosin (DMA) und Adenosin (A) an (a) Amberlite-Hydrayzid und (b) „Uridin-Amberlite“. Ordinate: Extinktion der Eluatfraktionen bei 260 (—) und 274 $m\mu$ (---). Abszisse: Elutionsvolumen (V_E) in Vielfachen des Flüssigkeitsvolumens der mit Harz gefüllten Säule (V_0)

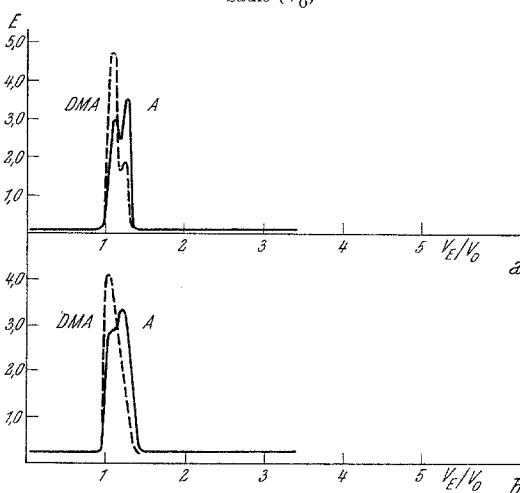


Abb. 2. Säulenchromatographie von Dimethyladenosin (DMA) und Adenosin (A) in $7m$ -Harnstofflösung an (a) Amberlite-Hydrayzid und (b) „Uridin-Amberlite“. Koordinaten wie in Abb. 1

in den Basenpaaren eine intermolekulare Wasserstoffbindung bildet, eingeführt worden ist, setzt also die Fähigkeit zur Komplexbildung mit der am Harz fixierten, komplementären Base herab.

Diese Resultate lassen sich nur so erklären, daß für die schwache Retention der Nukleoside an Amberlite-Hydrazid und insbesondere für die starke Retention an „Nukleosid-Amberlite“ zum überwiegenden Teil Wasserstoffbindungen verantwortlich sind. Wären vorwiegend Dipol—Dipol-Kräfte im Spiel, müßte Dimethyladenosin stärker als

Adenosin retardiert werden, da — wie sich leicht abschätzen läßt^{20, 21} — das Dipolmoment des ersten großen ist. Durch Einführung einer Methylgruppe wird zwar das Dipolmoment des Uridins ein wenig vermindert^{20, 21}, doch kann diese geringe Abnahme die schwächere Retention des Methyluridins nicht hinreichend

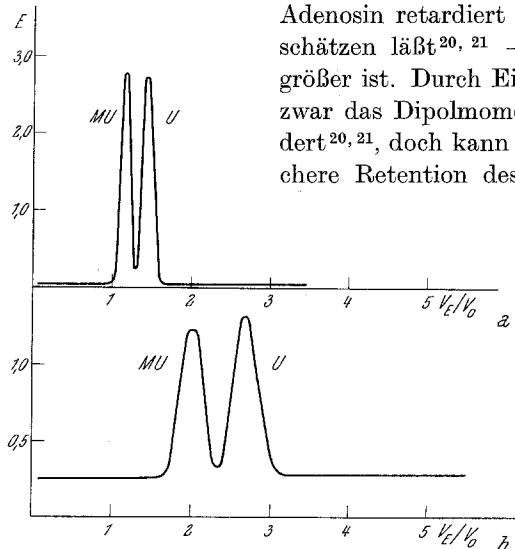


Abb. 3

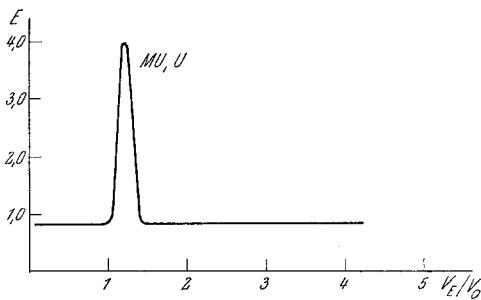


Abb. 4

Abb. 3. Säulenchromatographie von 3-Methyluridin (MU) und Uridin (U) an (a) Amberlite-Hydrazid und (b) „Adenosin-Amberlite“ Koordinaten wie in Abb. 1

Abb. 4. Säulenchromatographie von 3-Methyluridin (MU) und Uridin (U) in 7m-Harnstofflösung an „Adenosin-Amberlite“ Koordinaten wie in Abb. 1

erklären. Auch Dispersionskräfte allein sind als Wechselwirkungen auszuschließen, da in diesem Fall die Retention der Nukleoside durch Einführung einer Methylgruppe erhöht werden müßte.

Bei Verwendung von 7m-Harnstofflösung als Elutionsmittel steigen die *R*-Werte der Nukleoside und der alkylierten Nukleoside bis in die Nähe von 1 an und die Elutionsvolumina werden vom Säulenmaterial unabhängig (Abb. 2, 4). Dies ist ein Zeichen dafür, daß sich die Basenpaarbildung zwischen dem gelösten Nukleosid und der kovalent gebundenen, „komplementären“ Base in 7m-Harnstofflösung nicht mehr vollziehen kann.

²⁰ H. De Voe und I. Tinoco, J. Molec. Biol. **4**, 500 (1962).

²¹ H. A. Staab, „Einführung in die theoretische organische Chemie“ (Verlag Chemie), Weinheim 1960, S. 215.

Damit ist erwiesen, daß Harnstoff imstande ist, H-Bindungen — wenigstens solche zwischen den Basen gepaarter Nukleoside — zu spalten, wie es im übrigen auf Grund der Theorie der H-Bindung auch gut verständlich ist²². *Tomlinson* und *Tener*²³, die durch Verwendung von 7m-Harnstofflösung an Stelle wäßrigen Puffers bei der Säulenchromatographie von Oligonukleotiden an *DEAE*-Cellulose die nichtionischen Effekte eliminieren und diese Verbindungen sodann nur auf Grund ihrer Ladungen trennen konnten, führten die Harnstoffwirkung ebenfalls auf das Aufbrechen von H-Bindungen zurück. Im Gegensatz dazu stehen allerdings neuere Theorien über die Wirkungsweise des Harnstoffs bei der Eiweiß-Denaturierung; während man früher annahm, daß der Harnstoff die H-Brücken angreift, haben *Whitney* und *Tanford*²⁴ auf Grund ihrer Beobachtung, daß nur jene Aminosäuren in konz. Harnstofflösung besser als in Wasser löslich sind, die aromatische oder lange aliphatische Reste besitzen, auf eine Beeinflussung hydrophober Bindungen durch Harnstoff geschlossen. Durch Vergleich der pK_a -Werte von Maleinsäurederivaten in Wasser und konz. Harnstofflösung kamen *Levy* und *Magoulas*²⁵ zur Ansicht, daß H-Bindungen durch Harnstoff sogar noch stabilisiert werden können; unseres Erachtens dürfen aber die an Maleinsäurederivaten erhobenen Befunde nicht ohne weiteres auf andere Systeme übertragen werden, da in Maleinsäure und ihrem einfach negativ geladenen Anion durch die Möglichkeit mesomerer Stabilisierung extrem starke, intramolekulare H-Bindungen vorliegen²², wie sie bei der intermolekularen Wechselwirkung der Nukleosidbasen niemals im Spiele sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden: Die Untersuchung der chromatographischen Retention alkylierter Nukleoside hat die zunächst hypothetische Annahme bestätigt, daß die in der mobilen Phase frei gelösten Nukleoside mit den am Harz fixierten, „komplementären“ Basen durch Wasserstoffbrücken gebundene Paare bilden, die den Basenpaaren in der Deoxyribonukleinsäure und in homogenen Mischkristallen von Purin- und Pyrimidinderivaten entsprechen.

Die Bindungsstärke der Basenpaare wird der Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Für die Überlassung von 2-Mercapto-6-dimethylaminopurin-9-ribosid danken wir der Firma Roche Products Ltd., Welwyn Garden City, Herts, England.

²² *H. A. Staab*, „Einführung in die theoretische organische Chemie“ (Verlag Chemie), Weinheim 1960, S. 680, 694.

²³ *R. V. Tomlinson* und *G. M. Tener*, *Biochemistry* **2**, 697 (1963).

²⁴ *P. L. Whitney* und *C. Tanford*, *J. Biol. Chem.* **237**, PC 1735 (1962).

²⁵ *M. Levy* und *J. Magoulas*, *Federation Proc.* **20**, 381 (1961); *ibid.* **21**, 405 (1962).