

weitere 2 h gerührt; anschließend wurden mit einer Spritze 1.7 mL 1,4-Dioxan (30 mmol) zugegeben, worauf ein weißer Niederschlag von  $MgBr_2 \cdot 2(1,4\text{-Dioxan})$  ausfiel. Dieser wurde durch Filtration abgetrennt; die erhaltene klare Lösung wurde unter reduziertem Druck bis zur beginnenden Kristallisation konzentriert. Tiefkühlen auf  $-20^\circ\text{C}$  ergab farblose Kristalle von 2, die sich aus siedendem Ether umkristallisieren lassen. Die Ausbeute beträgt etwa 70 %. An Luft werden die Kristalle rasch braun; beim Erhitzen auf  $300^\circ\text{C}$  schmelzen sie nicht, spalten aber ab  $100^\circ\text{C}$  etwas Ether ab.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $25^\circ\text{C}$  in  $[D_6]\text{PhMe}$ ):  $\delta = 0.99$  (br, 36 H,  $\text{CH}_3(\text{Et}_2\text{O})$ ), 3.6 (br, 24 H,  $\text{CH}_2(\text{Et}_2\text{O})$ ), 6.75 (t, 4 H, p-H), 7.17 (m, 8 H, m-H), 7.48 (m, 8 H, o-H).  $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ -NMR (75.47 MHz,  $[D_6]\text{PhMe}$ ):  $\delta = 13.16$  (s,  $\text{CH}_3(\text{Et}_2\text{O})$ ) 64.51 ( $\text{CH}_2(\text{Et}_2\text{O})$ ), 113.21 (s, o-C), 124.04 (s, m-C). IR: Das IR-Spektrum (Nujol-Verreibung) von 2 weist im Metall-Ligand-Streckschwingungsbereich ( $< 600\text{ cm}^{-1}$ ) mehrere Banden mittlerer Intensität bei 502, 428, 363, 318 und  $245\text{ cm}^{-1}$  auf.

Eingegangen am 13. Oktober 1993 [Z 6415]

- [1] P. A. Petyunin, *Russ. Chem. Rev. Engl. Transl.* **1962**, *31*, 100.
- [2] L. Meunier, *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* **1903**, *136*, 758.
- [3] M. Okubo, Y. Inatomi, N. Taniguchi, K. Imamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 3581, zit. Lit.
- [4] T. Hascall, K. Ruhland-Senge, P. P. Power, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 350; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 356.
- [5] Kristalldaten bei  $130\text{ K}$  ( $\text{CuK}_{\alpha}$ -Strahlung,  $\lambda = 1.54178\text{ \AA}$ ):  $a = 42.748(7)$ ,  $b = 12.499(2)$ ,  $c = 23.270(3)\text{ \AA}$ ,  $\beta = 104.940(10)^\circ$ , monoklin, Raumgruppe  $P2_1/c$ ,  $Z = 8$ , 12319 Reflexe mit  $I > 2\sigma(I)$ ,  $R = 0.063$ . Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-57836 angefordert werden.
- [6] In jedem Molekül der asymmetrischen Einheit sind zwei der Br-Mg-Abstände (gestrichelt) deutlich länger als die anderen zehn, und zwar  $Mg1\text{-Br}1 = 3.337\text{ \AA}$  und  $Mg6\text{-Br}2 = 3.154\text{ \AA}$  gegenüber einem mittleren Wert von  $2.87\text{ \AA}$  für die anderen Mg-Br-Abstände.
- [7] M. M. Olmstead, P. P. Power, unveröffentlichte Ergebnisse, 1992.

## Starke, spezifische Bindung sechs verschiedener DNA-Sequenzen an einen konformativ flexiblen DNA-Makrocyclus \*\*

Ethel Rubin und Eric T. Kool\*

Bestimmte nucleinsäurebindende Proteine erkennen dank mehrerer Bindungsdomänen oder einer Konformationsänderung der spezifischen Bindungsdomäne unterschiedliche Substratstrukturen. Das *Xenopus*-Zinkfinger-Protein TFIIIA bindet zum Beispiel eine spezifische doppelsträngige DNA-Sequenz an eine deutlich verschiedene Sequenz ribosomaler RNA<sup>[1–5]</sup>. Wichtig ist dieser Wechsel der Bindungsstelle bei der Steuerung der Genexpression durch Rückkopplung. Vor kurzem begannen wir mit der Konzipierung und Synthese multifunktioneller DNA-erkennender Moleküle, die ein Mehrzentren-Bindungsverhalten nachahmen können<sup>[6]</sup>. Eine Bindung auf diese Art und Weise zu steuern, würde nicht nur die Möglichkeit bieten, eine komplexe biologische Funktion zu imitieren, sondern könnte auch praktische Bedeutung erlangen. So zeigten neuere In-vitro-Studien, in denen Oligonucleotide als sequenzspezifische Inhibitoren der Genexpression benutzt wurden, daß die Kombination von Substanzen, die mehrere Zielbereiche ansteuern, effektiver sein kann als eine Substanz mit nur einem Wirkort<sup>[7–9]</sup>.

[\*] Prof. E. T. Kool, E. Rubin  
Department of Chemistry, University of Rochester  
Rochester, NY 14627(USA)  
Telefax: Int. + 716/473-6889

[\*\*] Diese Arbeit wurde teilweise durch die National Institutes of Health (Grant RO1-GM46625) gefördert. E. T. K. dankt dem Young Investigator Program des Office of Naval Research (1992–1995), der Beckman Foundation (1992–1994), dem Army Research Office (1993–1996) und der Camille und Henry Dreyfus Teacher-Scholar-Stiftung (1993) für Unterstützung.

Vor kurzem beschrieben wir Entwurf und Synthese eines cyclischen Oligodesoxynucleotids, das dank der Möglichkeit eines Konformationswechsels an zwei verschiedene DNA-Sequenzen spezifisch binden kann<sup>[6]</sup>. Dieser Prototyp eines cyclischen DNA-Moleküls enthielt 36 Nucleotide und zwei Paare getrennter Bindungsdomänen mit je neun Basen, d. h. 18 Nucleotiden, für die Sequenzerkennung. Durch Austausch von Bindungs- und Brückendomänen konnten zwei Nonanucleotidsequenzen erkannt werden. Um die Grenzen dieser multifunktionellen Bindung auszuloten, untersuchten wir nun ein cyclisches DNA-Molekül, das sechs Konformationen annehmen und sechs unterschiedliche Nucleotidsequenzen erkennen kann. Die sorgfältige Planung des cyclischen Nucleotids ermöglichte den Verzicht auf überflüssige Basen, d. h. einen äußerst ökonomischen Baseneinsatz: Obwohl es selbst aus nur 35 Nucleotiden besteht, erkennt das Molekül selektiv sechs Octanucleotide, d. h. zusammen 48 Nucleotide.

Der Entwurf des DNA-Makrocyclus **1** berücksichtigt die folgenden Überlegungen (Abb. 1). Erstens kann es zur Tripelhelix-Bildung kommen, indem gegenüberliegende Pyrimidindomänen des Makrocyclus an die komplementären Purinsequenzen eines Octanucleotids binden (Watson-Crick- und Hoogsteen-Bin-

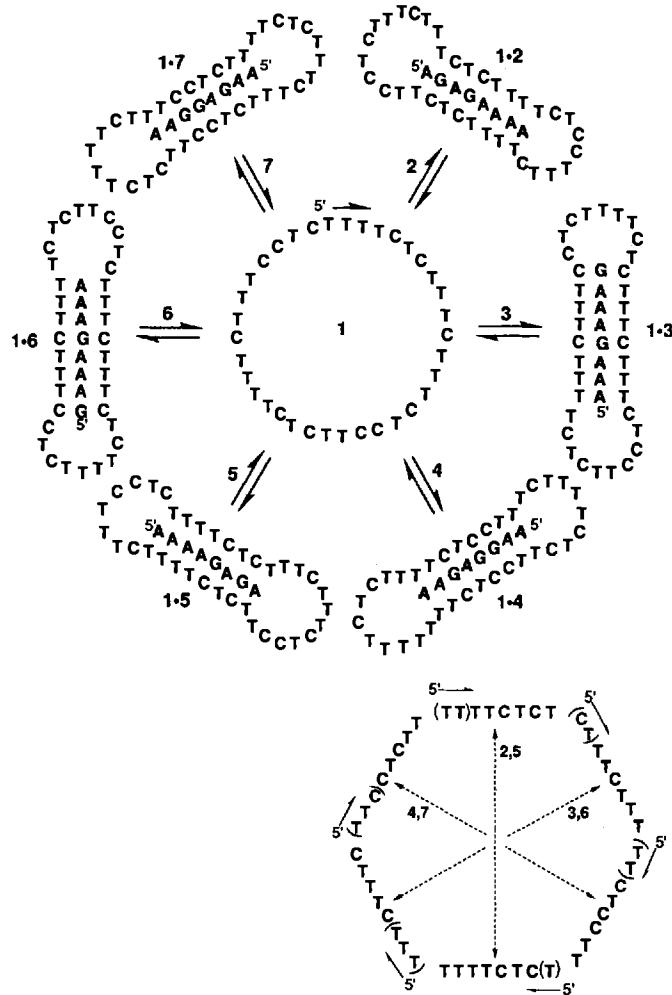


Abb. 1. Oben: Sequenz des cyclischen Oligodesoxynucleotids **1** (im Zentrum) sowie die Addukte von **1** mit den komplementären Sequenzen **2**–**7**. Unten: Strategien zur Konstruktion von **1**. Die drei Domänenpaare, die zur Bildung der Tripelhelices nötig sind, sind so angeordnet, daß sich die Paarhälften jeweils gegenüber liegen (Pfeile weisen auf die zusammengehörigen Paare). In Klammern sind die Nucleotide angegeben, die eingespart wurden, da sie am Ende der jeweils benachbarten Sequenz bereits enthalten sind.

dung). Die Folge wäre eine stärkere Bindung und eine höhere Sequenzselektivität als bei einfacher Watson-Crick-Bindung<sup>[10, 11]</sup>. Zweitens kann ein Bindungsdomänenpaar sowohl vorwärts im Watson-Crick-Modus (in 5' → 3'-Richtung) als auch rückwärts im Hoogsteen-Modus (in 3' → 5'-Richtung) an eine gegebene Sequenz binden, da die beiden Pyrimidindomänen des Rings 1 pseudospiegelbildlich angeordnet sind. Drittens erlaubt die aufeinanderfolgende Plazierung der drei Bindungsdomänenpaare, sechs verschiedene Sequenzen zu binden (drei in eine und drei in die entgegengesetzte Richtung). Die Erkennung einer Sequenz durch ein Domänenpaar lässt dann die anderen Domänen als brückenbildende Schleifen des Komplexes fungieren<sup>[16]</sup>. Schließlich kann auch mit einer reduzierten Zahl an Nucleotiden im Ring die Mehrfachbindung erreicht werden: Entfernt man jene Nucleotide, die am Ende und Anfang benachbarter Domänen gleich sind, einmal, so überlappen die Domänen, und einzelne Basen erhalten mehr als eine Funktion.

Wir planten und synthetisierten den Makrocyclus 1, um die sechs Octanucleotidsequenzen 2–7 zu erkennen (Abb. 1). Ordnete man die Pyrimidin-Bindungsdomänen kreisförmig nacheinander an, würde ein DNA-Makrocyclus mit 48 Nucleotiden entstehen. Durch das Überlappen der Domänenenden (Abb. 1 unten) konnten wir jedoch 13 Basen einsparen und den Ring 1 auf 35 Nucleotide begrenzen.

Die Sequenzselektivität sollte bei 1 ähnlich sein wie bei früher beschriebenen anderen cyclischen Oligonucleotiden<sup>[10]</sup>. Um dies zu prüfen, synthetisierten wir zusätzlich die Sequenzen 8 und 9 (Abb. 2), die sich von den Oligodesoxynucleotiden 5 bzw. 4 durch den Austausch zweier Basen unterscheiden.

Die Bindung zwischen 1 und den Purinsequenzen 2–9 wurde durch Untersuchung der thermischen Denaturierung mit Hilfe optischer Messungen bei 260 nm charakterisiert. Die Komponenten wurden im Verhältnis 1:1 bei pH 7.0 (100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) gemischt. Die Schmelzkurven zeigen scharfe Übergänge zwischen zwei Zuständen bei den Mischungen aus 1 und 2–7. Die Schmelztemperaturen der Tripelhelix-Komplexe sind deutlich höher, als sie bei einfachen Watson-Crick-Komplexen (Doppelhelices) zu erwarten wären<sup>[11]</sup> (siehe unten). Die Schmelztemperaturen der Komplexe von 1 mit 2–7 liegen alle im Bereich von 33–37 °C (Abb. 2 oben); die Hypochromiewerte betragen 18–25 %. Für eine Tripelhelix-Bildung spricht auch der Befund, daß die Stabilität aller sechs Komplexe pH-abhängig ist (Daten nicht gezeigt). Eine pH-Abhängigkeit ist für Komplexe mit C · G · C-Triaden, nicht jedoch für Doppelhelices zu erwarten<sup>[12]</sup>.

Im Gegensatz zu den Sequenzen 2–7 binden 8 und 9 mit T<sub>m</sub>-Werten von 18.8 bzw. 19.6 °C viel schwächer an 1. Entsprechend liegen die Komplexe bei Raumtemperatur vollständig dissoziiert vor. Mit Kurvenanpassungs-Algorithmen<sup>[13]</sup> wurden die freien Energien der Komplexe aus 1 und 2–9 abgeschätzt. Danach sind die Komplexe 1 · 2–1 · 7 mit Freien Energien ( $\Delta G_{25}^{\circ}$ ) von 10.3–12.2 kcal mol<sup>-1</sup> gebunden. Die Mismatch-Purinsequenzen 8 und 9 sind hingegen mit Freien Energien von nur 6.5 bzw. 6.6 kcal mol<sup>-1</sup> viel schwächer an 1 gebunden. Danach bindet 1 die komplementären Sequenzen um drei bis vier Größenordnungen besser als die nicht komplementären.

Aus der Struktur von 1 ergibt sich noch eine weitere Art von Komplementarität und Selektivität. Da der Makrocyclus entwickelt wurde, um die Sequenzen 2–7 durch eine Tripelhelix-Bildung zu erkennen, kann er 29 weitere Octanucleotidsequenzen im Watson-Crick-Modus binden. Um zu testen, wie selektiv 1 die Sequenzen 2–7 im Vergleich zu den 29 anderen bindet, synthetisierten wir die drei Purinoctamere 10–12, die nur im Watson-Crick-Modus voll komplementär mit Sequenzen im Ring sind. Die komplementären Bindungsstellen für 10–12 sind

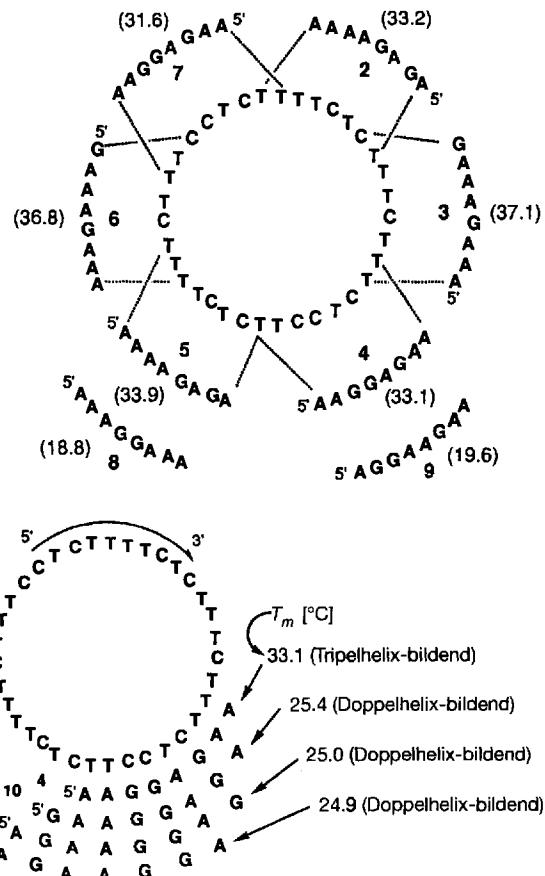


Abb. 2. Oben: Schmelztemperaturen  $T_m$  [°C] der Komplexe von 1 mit den komplementären Sequenzen 2–7 sowie den nicht komplementären Strängen 8 und 9. Unten: Vergleich der Stabilität des Tripelhelix-Komplexes aus 1 und 4 mit der der Watson-Crick-Komplexe aus 1 und 10–12 anhand der Schmelztemperaturen. Die Octamere 4 und 10–12 haben überlappende Sequenzen mit jeweils einem Ein-Basis-Frameshift.

gegenüber der für 4 nur um eine, zwei bzw. drei Basen verschoben (Abb. 2 unten).

Diese zusätzlichen Bindungsstudien zeigen, daß 1 zwar komplementär zu den Watson-Crick-Sequenzen 10–12 ist, aber dennoch eine deutliche höhere Affinität zu den Tripelhelix-bildenden Sequenzen 2–7 hat. 10–12 sind mit  $T_m$ -Werten von 24.9–25.4 °C und Hypochromiewerten von 10–16 %, 2–9 mit  $T_m$ -Werten von 33.1–37.1 °C und Hypochromiewerten von 18–25 % gebunden. Die Freie Energie der Bindung unterscheidet sich um 2.1–4.3 kcal mol<sup>-1</sup>. Die Assoziationskonstante ist für 1 · 2–1 · 7 bei 25 °C 34- bis 1400fach größer als für 1 · 10–1 · 12, da in diesen nicht die vollständige Anzahl an stabilisierenden Hoogsteen-Bindungen ausgebildet werden kann. Die niedrigen Hypochromiewerte bei 1 · 10–1 · 12 decken sich mit der Annahme, daß in diesen Komplexen keine Hoogsteen-Bindungen vorliegen. Die Möglichkeit einer teilweisen Hoogsteen-Interaktion kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Die Selektivität von 1 liegt jedoch im Bereich, der auch für lineare Oligodesoxynucleotide bei Einzelbasen-Falschpaarungen charakteristisch ist<sup>[10]</sup>. Das cyclische Nucleotid 1 kann also eindeutig zwischen den sechs Zielsequenzen 2–7 und den anderen komplementären oder teilweise komplementären DNA-Sequenzen unterscheiden.

Ein komplexes multifunktionelles Verhalten kann also mit einem synthetischen DNA-erkennenden Molekül erreicht werden. Die Entwicklung des Oligonucleotid-Makrocyclus 1 zeigt

Wege, die Bindungseigenschaften von DNA-Molekülen durch mehr als die Änderung der primären Nucleotidsequenz zu steuern. Eine Cyclisierung und die Plazierung von Bindungsdomänen auf gegenüberliegenden Seiten im Makrocyclus sowie die Pseudosymmetrie der Domänen ermöglichen eine stärkere Kontrolle der sekundären und tertiären Wechselwirkungen in den Komplexen als bei reiner Watson-Crick-Bindung. Es ist denkbar, daß diese Art der Multizentren-Bindung für praktische Probleme der Nucleinsäureerkennung, z.B. bei der Inhibierung der Genexpression, bei der mehr als eine Stelle eines Gens oder mehr als ein Gen eines Organismus beteiligt sind, eingesetzt werden könnte.

### Experimentelles

Die Oligonukleotide **2**–**10** wurden mit einem Synthesearmaten der Firma Pharmacia LKB mit der  $\beta$ -Cyanethylphosphoramid-Methode hergestellt [14]. Gereinigt wurden sie durch präparative denaturierende Polyacrylamid-Gelektrophorese. Die Konzentrationen wurden mit Absorptionsmessungen bei 260 nm aus den Absorptionskoeffizienten (Nearest-Neighbour-Analyse [15]) bestimmt. Zur Herstellung von **1** wurden der lineare Vorläufer 5'-dTTTCTTCCTCTTCTCTTCTCCCTCTCp und das Templat 5'-DAGAAAAGAGAA synthetisiert. Die Cyclisierung fand in einer wäßrigen nicht-enzymatischen Ligation mit jeweils 50  $\mu$ M des linearen Vorläufermoleküls und des Templat statt: 200 mM Imidazol · HCl (als Ausgangslösung vor Zugabe zum Reaktionsgemisch auf pH 7.0 titriert), 100 mM NiCl<sub>2</sub> und 125 mM BrCN, 12 h bei 23 °C [11, 16]. Aufarbeitung und Isolierung wie bereits früher beschrieben [11, 17]. Der Umsatz zum cyclischen Produkt betrug nach Gel-Analyse ca. 70%. Isoliert wurde es mit einer Ausbeute von 43% durch Eluieren aus dem präparativen Gel gefolgt von einer Dialyse zum Entfernen der Salze. Die vollständige Resistenz gegenüber einem Gemisch aus T4-DNA-Polymerase (3'-Exonuclease-Aktivität) und T4-Poly-nukleotid-Kinase (3'-Phosphatase-Aktivität in Abwesenheit von ATP) unter Bedingungen, unter denen lineare Oligonukleotide zu Mononukleotiden gespalten werden, bestätigte die cyclische Struktur des Produkts. Die Spaltung wurde bei 37 °C 1–40 min in einer Lösung mit 23  $\mu$ M DNA, 58 mM Tris · HCl (pH 7.6), 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM Dithiothreit, 100  $\mu$ M Spermidin, 100  $\mu$ M EDTA, 0.5 Units/ $\mu$ L Kinase

und 0.1–0.2 Units/ $\mu$ L Polymerase durchgeführt. T4-Kinase wurde von New England Biolabs und T4-Polymerase von United States Biochemical bezogen.

Die thermische Denaturierung der 1:1-Komplexe wurde bei einer Gesamtoligonukleotid-Konzentration von 6  $\mu$ M in einem Puffer mit 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM Na-PIPES(HPIPES = 1,4-Piperazindiethansulfonsäure) bei pH 7.0 in verschlossenen 1 cm-Küvetten durchgeführt. Vor der Denaturierung wurden die Proben 2 min auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Denaturierung wurde in einem temperaturkontrollierten Varian-Cary-1-UV-VIS-Sepktrometer unter Stickstoff durchgeführt. Die Temperatur wurde um 0.5 °K pro Minute erhöht. Als Referenz dienten Proben des gleichen Puffers ohne DNA. Die Kurvenanpassung wurde wie früher beschrieben vorgenommen [8, 10]. Die  $T_m$ -Werte wurden mit einer Genauigkeit von  $\pm 0.5$  °C aus der ersten Ableitung der Auftragung der Absorbanz gegen  $T^{-1}$  ermittelt. Die Genauigkeit der Bestimmung der freien Energie liegt bei  $\pm 10$ –15%.

Eingegangen am 24. November 1993 [Z 6510]

- [1] J. Miller, A. D. McLachan, A. Klug, *EMBO J.* **1985**, *4*, 1609–1614.
- [2] N. P. Pavletich, C. O. Pabo, *Science* **1991**, *252*, 809–817.
- [3] H. R. B. Pelham, D. D. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 4170–4174.
- [4] B. M. Honda, R. G. Roeder, *Cell* **1980**, *22*, 119–126.
- [5] M. S. Sands, D. F. Bogenhagen, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 1791–1796.
- [6] E. Rubin, E. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 301–302.
- [7] L. J. Maher III, B. J. Dolnick, *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *253*, 214–220.
- [8] J. Lisziewicz, D. Sun, M. Klotman, S. Agrawal, P. Zamecnik, R. Gallo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 11209–11213.
- [9] R. Morgan, M. Edge, A. Colman, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 4615–4620.
- [10] E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6265–6266.
- [11] G. Prakash, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3523–3527.
- [12] D. S. Pilch, C. Levenson, R. H. Shafer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1942.
- [13] M. Petersheim, D. H. Turner, *Biochemistry* **1983**, *22*, 256–263.
- [14] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859–1862.
- [15] P. N. Borer in *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. I (Hrsg.: G. D. Fasman), 3. Aufl., CRC, Cleveland, OH, USA, **1985**, S. 589.
- [16] S. Rumney, E. T. Kool, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1686–1689; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1617–1619.
- [17] G. Prakash, E. Rubin, E. T. Kool, noch unveröffentlichte Ergebnisse.