

1H; Pro-H5), 4.14 (dd, $J = 4.6, 8.3$ Hz, 1H; Pro- α H), 4.41 (dd, $J = 6.3, 9.0$ Hz, 1H; Phe- α H), 7.21 (m, 2H; arom.), 7.32 (m, 3H; arom.); ^{13}C -NMR (75.4 MHz, CD_3OD , 25°C): $\delta = 25.24, 26.35, 30.78, 38.29, 48.45, 54.19, 61.65, 129.05, 130.07, 130.24, 130.37, 130.61, 135.44, 168.53, 174.55$; hochaufgelöstes MS: ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ (M^+): m/z : 275.1534; gef.: 275.1644.

4: TFA-L-Phe-L-Pro-NHCH₃; ^1H -NMR (500 MHz, D_2O , 25°C, CH_3CN): *trans*-Konformer: $\delta = 1.77$ (m, 1H; Pro-H3'), 1.85 (m, 2H; Pro-H4 und Pro-H4'), 2.13 (m, 1H; Pro-H3), 2.64 (s, 3H; CH₃), 2.99 (dd, $J = 14.5, 7.5$ Hz, 1H; Phe- β H'), 3.21 (dd, $J = 14.5, 6.2$ Hz, 1H; Phe- β H), 3.25 (m, 1H; Pro-H5'), 3.61 (m, 1H; Pro-H5), 4.27 (dd, $J = 6.3, 8.1$ Hz, 1H; Pro- α H), 4.43 (pseudo-t, $J = 7.3$ Hz, 1H; Phe- α H), 7.24 (m, 2H; arom.), 7.30 (m, 3H; arom.); *cis*-Konformer: $\delta = 1.56$ (m, 3H; Pro-H3, Pro-H3' und Pro-H4), 1.70 (m, 1H; Pro-H4), 2.60 (s, 3H; CH₃), 2.90 (dd, $J = 13.2, 9.8$ Hz, 1H; Phe- β H), 3.05 (dd, $J = 13.2, 5.4$ Hz, 1H; Phe- β H'), 3.29 (m, 1H; Pro- α H), 3.33 (m, 1H; Pro-H5), 3.42 (m, 1H; Pro-H5'), 3.80 (dd, $J = 9.8, 5.4$ Hz, 1H; Phe- α H), 7.13 (m, 2H; arom.), 7.27 (m, 3H; arom.); ^{13}C -NMR (75.4 MHz, CD_3OD , 25°C): $\delta = 23.08, 26.00, 26.36, 26.66, 30.45, 32.62, 37.70, 38.90, 54.41, 61.38, 61.85, 128.89, 129.11, 130.13, 130.51, 130.81, 135.36, 135.43, 168.65, 174.15$; hochaufgelöstes MS: ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ (M^+): m/z : 275.1534; gef.: 275.1633.

1 wurde nach bekannten Vorschriften synthetisiert [17]: ^1H -NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 25°C): $\delta = 8.98$ (s, 2H; CH), 8.09 (m, 2H; CH), 7.74 (s, 2H; CH), 7.39 (m, 4H; CH), 6.87 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H; CH), 5.74 (m, 28H; OH), 4.82 (m, 14H; CH), 4.48 (m, 12H; OH), 3.65 (m, 56H; 4 CH, 2 CH₂), 3.30 (m, 28H; CH). ^{13}C -NMR (75.4 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 25°C): $\delta = 164.6, 156.2, 142.2, 139.3, 137.3, 128.0, 121.7, 120.7, 120.5, 116.3, 102.5, 102.0, 101.7, 84.9, 81.6, 81.4, 73.1, 72.9, 72.4, 72.1, 70.1, 60.0, 59.6$. FAB-MS: ber. für $\text{C}_{104}\text{H}_{151}\text{N}_2\text{O}_{70}\text{S}_2\text{Ni}$ ($[M + \text{H}]^+$): m/z : 2671.7; gef.: 2672; UV/Vis (H_2O): λ_{max} (ϵ) = 374 (20000), 273 (55000) nm.

Eingegangen am 22. Januar 1996 [Z8743]

Stichworte: Cyclodextrine • Kombinatorische Chemie • Molekulare Erkennung • Peptide

- [1] M. L. Bender, M. Komiyama, *Cyclodextrin Chemistry*, Springer, New York, 1978; W. Saenger, *Angew. Chem.* 1980, 92, 343–361; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1980, 19, 344–362; J. Szejtli, *Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes*, Akademiai Kiado, Budapest, 1982.
- [2] R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* 1991, 24, 159–164.
- [3] Übersicht: R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* 1995, 28, 146–153.
- [4] K. Matsuyama, S. El-Gizawy, J. H. Perrin, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1987, 13, 2687–2691; J. Horsky, J. Pitha, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 1994, 18, 291–300.
- [5] A. Wutte, G. Gubitz, S. Friebe, G.-J. Krauss, *J. Chromatogr. A* 1994, 661, 7–12; *ibid.* 1994, 677, 186–191; K. B. Lipkowitz, S. Raghothama, J. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 1554–1562.
- [6] Übersichten: M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon, *J. Med. Chem.* 1994, 37, 1233–1251, 1385–1401.
- [7] A. Borchardt, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 7467–7468; H. Wennekers, S. S. Yoon, W. C. Still, *J. Org. Chem.* 1995, 60, 1108–1109.
- [8] TentaGel-S-NH₂ von Rapp Polymere: E. Bayer, *Angew. Chem.* 1991, 103, 117–133; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 30, 113–129.
- [9] 15 Reportermoleküle (fünf Reportermoleküle pro AAn) wurden dem publizierten Protokoll folgend zur Kodierung der Bibliothek verwendet: M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 10922–10926.
- [10] AAn = Gly, D-Ala, D-Ala, D-Val, L-Val, D-Leu, L-Leu, D-Phe, L-Phe, D-Pro, L-Pro, D-Ser, L-Ser, D-Thr, L-Thr, D-Asp, L-Asp, D-Glu, L-Glu, D-Asn, L-Asn, D-Gln, L-Gln, D-His, L-His, D-Lys, L-Lys, D-Arg, L-Arg. Tyrosin und Tryptophan waren nicht in der Bibliothek enthalten.
- [11] K. A. Connors, *Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley, New York, 1987; KaleidaGraph von Abelbeck Software.
- [12] NOE-Experimente bestätigten die Identität der *s-trans*- und *s-cis*-Konformere beider Dipeptide. Das *s-trans*-Konformer zeigt einen starken NOE zwischen dem Phe- α H und dem Pro-H4, das *s-cis*-Konformer einen zwischen dem Phe- α H und dem Pro- α H. Die Zuordnung aller Signale erfolgte mit Hilfe von ^1H , ^1H -COSY-Experimenten.
- [13] D. Q. McDonald, W. C. Still, *Tetrahedron Lett.* 1992, 33, 7743–7746; H. Senderowitz, C. Parish, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, im Druck.
- [14] W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, T. Hendrickson, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 6127–6129.
- [15] G. Chang, W. C. Guida, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 4379–4386.
- [16] CSD BCDEXD1: K. Lindner, W. Saenger, *Angew. Chem.* 1978, 90, 738–740; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1978, 17, 694–695.
- [17] W. Zhang, E. N. Jacobsen, *J. Org. Chem.* 1991, 56, 2296–2298.

Sequenzspezifische DNA-Erkennung durch einen in der großen und der kleinen Furche bindenden Liganden**

Jason W. Szewczyk, Eldon E. Baird und Peter B. Dervan*

Oligonucleotid-vermittelte Tripelhelixbildung^[1] sowie DNA-Komplexierung durch Pyrrol/Imidazol-Polyamide^[2] sind zwei nichtbiologische Ansätze zur sequenzspezifischen Erkennung von doppelsträngiger DNA. Die Erkennung der großen DNA-Furche wird durch Pyrimidin-Oligonucleotide vermittelt, die parallel zum Watson-Crick-Purin-Strang binden^[1]. Die Spezifität wird durch die Bindung von Thymin (T) an Adenin-Thymin-Basenpaare (T · AT-Basentriplets) sowie durch die Bindung von protoniertem Cytosin (C⁺) an Guanin-Cytosin-Basenpaare (C⁺ · GC-Basentriplets) erreicht^[1]. Zur Erkennung der kleinen DNA-Furche dienen Polyamide aus *N*-Methylimidazol- (Im) und *N*-Methylpyrrol-Aminosäuren (Py), wobei die DNA-Sequenzspezifität durch die lineare Sequenz der Pyrrol- und Imidazol-Aminosäuren bestimmt wird^[2–4]. Die antiparallele Paarung von Imidazol- und Pyrrolcarboxamid-Einheiten ermöglicht die Erkennung von GC-Basenpaaren, während umgekehrt angeordnete Pyrrolcarboxamid- und Imidazol-Einheiten CG-Basenpaare erkennen^[2]. Die durch Kombination von zwei Pyrrol-Einheiten vermittelte Erkennung ist teilweise degeneriert, sie erlaubt die Bindung von TA- und von AT-Basenpaaren^[2, 3]. Ein Pyrrol/Imidazol-Polyamid-„Haarnadel“-Ligand mit γ -Aminobuttersäure (γ) als „Turn“-Einheit ist ein vielseitiges Bindungsmotiv zur hochaffinen Erkennung einer Vielfalt von DNA-Sequenzen in der kleinen DNA-Furche^[5]. Eine Schlüsselfrage in bezug auf die beschriebenen Strategien zur Erkennung der großen und der kleinen DNA-Furche ist, ob beide Bindungsmotive in einem Molekül kombiniert werden können, ohne daß die Sequenzspezifität der jeweiligen Erkennungsdomänen verloren geht.

Wir berichten hier über ein „Haarnadel“-Polyamid, das mit einem Nucleotid-Undecamer verknüpft wurde. Dieses Konjugat bindet bei subnanomolaren Konzentrationen spezifisch und gleichzeitig an die große und die kleine DNA-Furche. Die Verknüpfung des Pyrimidin-Oligonucleotids 5'-TTTTT^{Me}C^{Me}C-TTT-3' über einen Linker aus zwölf Atomen in der Kette mit dem Polyamid ImPyPy/ImPyPy β ($\beta = \beta$ -Alanin) ermöglicht die Erkennung eines 16 Basenpaare langen Segmentes einer DNA-Doppelhelix. Hierbei wird jeweils spezifisch ein Pyrrol/Imidazol-Polyamid-DNA-Komplex in der kleinen Furche sowie eine Tripelhelix in der großen Furche gebildet (Abb. 1) und durch 10 Wasserstoffbrückenbindungen zur Erkennung von 5 Basenpaaren in der kleinen Furche (5'-TGACA-3') bzw. 22 Wasserstoffbrückenbindungen zur Erkennung von 11 Basenpaaren in der großen Furche (5'-AAAAAAGGAAA-3') stabilisiert.

Das am C-Terminus mit einer freien Aminogruppe versehene Polyamid ImPyPy/ImPyPy β wurde durch Festphasensynthese^[6, 7] hergestellt. Umsetzung mit Essigsäureanhydrid liefert das Polyamid 1, das als Standard dient. Reaktion der freien Aminogruppe von ImPyPy/ImPyPy β mit festphasengebundenem *N*-

[*] Prof. P. B. Dervan, J. W. Szewczyk, E. E. Baird
Arnold and Mabel Beckman Laboratories of Chemical Synthesis
California Institute of Technology
Pasadena, CA 91125 (USA)
Telefax: Int. + 818/683-8753

[**] Wir danken den National Institutes of Health für die Unterstützung (GM-27681) sowie dem Howard Hughes Medical Institute für ein Doktorandenstipendium (E. E. B.).

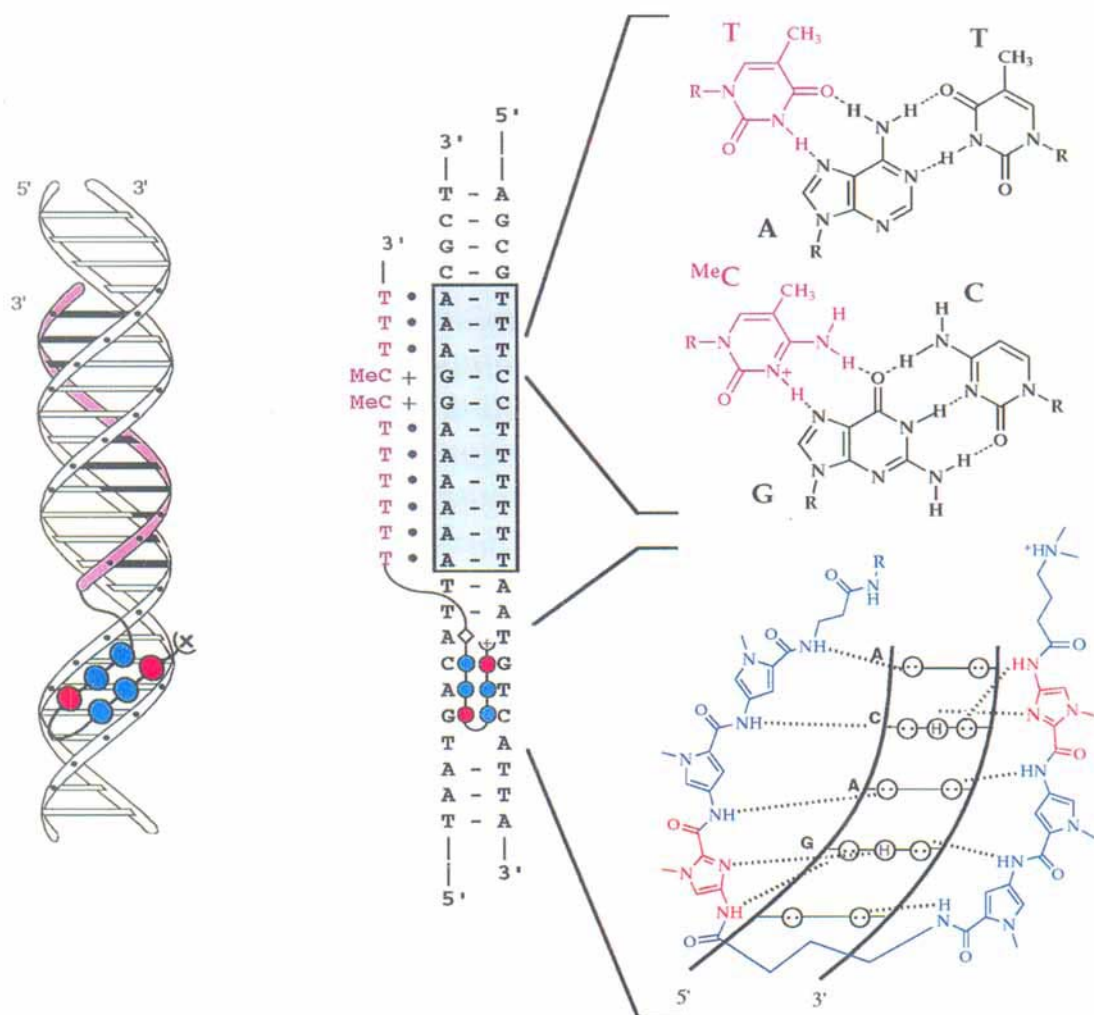
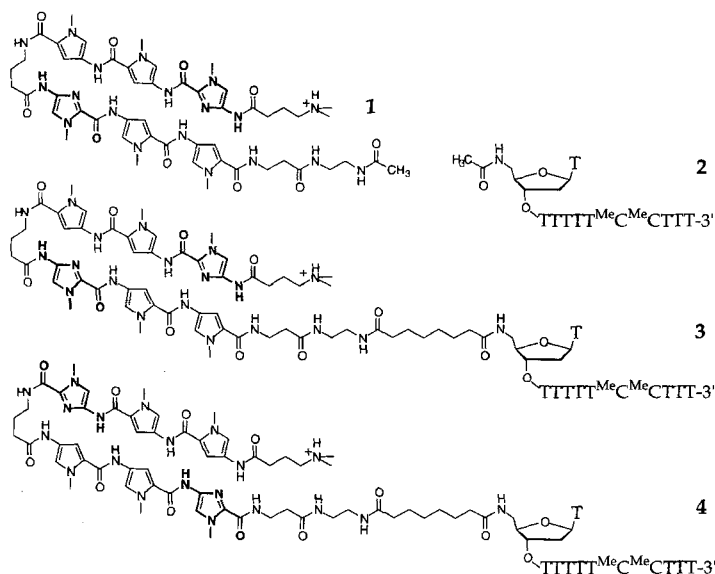


Abb. 1. Links: Simultane Bindung eines Pyrrol/Imidazol-Polyamid-Oligonucleotids an die große (oben) und die kleine Furche (unten) einer DNA-Doppelhelix (Bandmodell). Rote und blaue Kreise stellen *N*-Methylimidazol- bzw. *N*-Methylpyrrol-Einheiten dar, die Raute repräsentiert eine β -Alanin-Einheit. Rechts: Zweidimensionale Beschreibung der molekularen Wechselwirkungen, die für die sequenzspezifische DNA-Erkennung entscheidend sind: Oben: durch Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen von T zum Watson-Crick-AT-Basenpaar sowie von protoniertem MeC^+ zum Watson-Crick-GC-Basenpaar gebildete T \cdot AT- bzw. $\text{MeC}^+\cdot$ GC-Basentriplets. Die Basen des dritten Strangs sind rosa, die der Watson-Crick-Stränge schwarz dargestellt; unten: zu erwartende Wechselwirkungen zwischen ImPyPy/ImPyPy β und der Bindungsstelle 5'-TGACA-3'. Kreise mit Punkten repräsentieren die freien Elektronenpaare der N3-Atome der Purinbasen sowie der O2-Atome der Pyrimidinbasen. Kreise, die ein H enthalten, stellen das Wasserstoffatom am N2-Atom eines Guaninrestes dar. Die postulierten Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien wiedergegeben.

Hydroxysuccinimidester des entsprechend 5'-modifizierten Nucleotid-Undecamers 5'-TTTTT $\text{MeC}^+\text{MeC}^+\text{CTTT}$ -3' liefert nach Entschützen das Konjugat ImPyPyImPyPy β -(Linker)-TTTTT $\text{MeC}^+\text{MeC}^+\text{CTTT}$ -3' **3**^[8]. Analog wurde das Konjugat **4** mit der umgekehrten Polyamid-Sequenz PyPyImPyPyImPy β syn-

thetisiert. Die Polyamid-Oligonucleotide **3** und **4** wurden durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt und durch matrixunterstützte Laserdesorptions/ionisations-Flugzeit(MALDI-TOF)-Massenspektrometrie^[9], UV-spektroskopisch^[10] sowie durch HPLC-Analyse der nach enzymatischer Phosphodiester-Hydrolyse erhaltenen Fragmente charakterisiert. Für die Bindungsstudien wurde ein DNA-Fragment aufgebaut, das die 18 Basenpaare umfassende Bindungsstelle 5'-TGACATTAAAAAGGAAA-3' enthält, die aus der 5 Basenpaare langen Bindungsstelle für das Polyamid und der 11 Basenpaare langen Bindungsstelle für das Oligonucleotid sowie aus zwei Basenpaaren zur Trennung der beiden Bindungsstellen besteht. Zur Kontrolle sind die Bindungsstellen für das isolierte Polyamid (5 Basenpaare) und das Oligonucleotid (11 Basenpaare) ebenfalls im DNA-Fragment enthalten^[11].

Durch quantitative DNase-I-Footprint-Titrationsexperimente^[12] mit einem 302 Basenpaare langen Restriktionsfragment wurden die Bindungsaffinitäten der Liganden bestimmt (Abb. 2). Das Polyamid **1** bindet an die Zielsequenz 5'-TGACATTAAAAAGGAAA-3' mit einer Assoziationskonstante $K_a = (1.3 \pm 0.3) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ und das unmodifizierte Oligonucleotid **2** an 5'-TGACATTAAAAAGGAAA-3' mit $K_a = (2.5 \pm 0.8) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Das Polyamid-Oligonucleotid-Konjugat **3** bindet an 5'-TGACATTAAAAAGGAAA-3' mit einer Assoziationskonstante $K_a > 2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ^[13], was einer mindestens 150fachen Steigerung der Bindungsaffinität relativ zu den nichtverknüpften Untereinheiten entspricht. Im Vergleich hierzu ist die Bindungs-



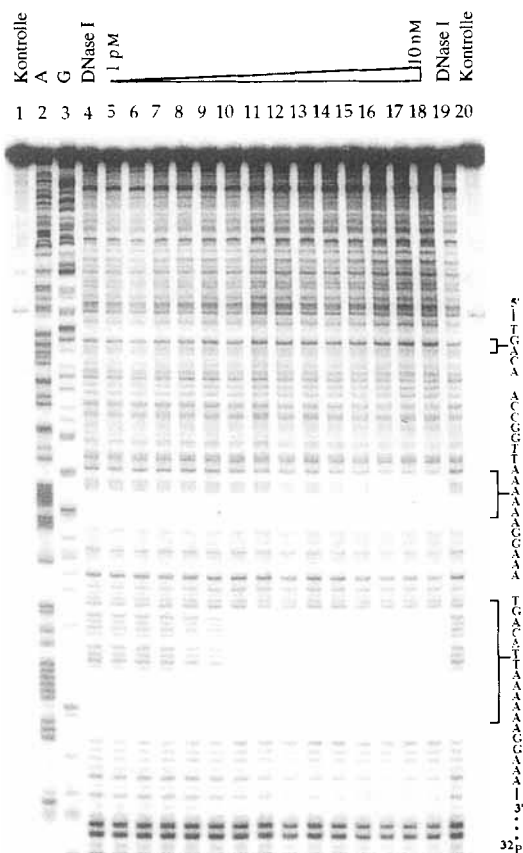


Abb. 2. DNase-I-Footprint-Titration des Pyrrol/Imidazol-Polyamid-Oligonucleotids **3** mit einem ^{32}P -endmarkierten, 302 Basenpaare langen Restriktionsfragment. Graustufendarstellung des „Storage-Phosphor“-Autoradiogramms eines denaturierenden 8%-Polyacrylamid-Gels, das eine 10fache Signaländerung von der schwächsten (5 willkürliche Einheiten, weiß) zur stärksten Intensität (50 willkürliche Einheiten, schwarz) zeigt. Die Bindungsstelle ist rechts dargestellt. Spuren 1 und 20: intakte DNA; Spur 2: A-Reaktion; Spur 3: G-Reaktion; Spuren 4 und 19: DNase-I-Standard; Spuren 5 bis 18: 1, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 250, 400 und 650 pM sowie 1.5, 2.5, 6.5 und 10 nM **3**.

affinität von **3** zur 5 Basenpaare langen Bindungsstelle des Polyamids, 5'-TGACATTAGCTCGTAATG-3' ($K_a < 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), oder zur 11 Basenpaare langen Bindungsstelle des Oligonucleotids, 5'-ACCGGTTAAAAAGGAAA-3' ($K_a = 1.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$), um etwa um den Faktor 10 gegenüber der der „Match“-Sequenz verringert. Das „Mismatch“-Polyamid-Oligonucleotid **4** bindet die 18 Basenpaare umfassende Sequenz 5'-TGACATTAAAAAGGAAA-3' ($K_a = (6.1 \pm 0.2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) mit einer 300fach verminderten Affinität relativ zum „Match“-Konjugat **3**.

Das Polyamid-Oligonucleotid **3** bindet mit subnanomolarer Affinität nur an die vorgesehene Zielsequenz. Die Erhöhung der Bindungsaffinität um $3.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ wird also durch die gleichzeitige sequenzspezifische Erkennung von großer und kleiner DNA-Furche erzielt. Polyamid-„Haarnadel“-Oligonucleotid-Liganden erweitern somit durch Nachahmung von sequenzspezifischen DNA-bindenden Proteinen^[14] das synthetisch zugängliche Repertoire an DNA-Erkennungssequenzen. Gleichzeitig repräsentieren sie ein neues Bindungsmotiv zur simultanen, sequenzspezifischen Erkennung beider Furchen der DNA-Doppelhelix.

Eingegangen am 25. März 1996 [Z 8974]

Stichworte: DNA · Polyamide · Tripelhelix

- [1] a) H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, 238, 645; b) T. Le Doan, L. Perrouault, D. Praseuth, N. Habhouh, J. L. Decout, N. T. Thong, J. Lhomme, C. Helene, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 7749.
- [2] a) W. S. Wade, M. Mrksich, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8783; b) M. Mrksich, W. S. Wade, T. J. Dwyer, B. H. Geierstanger, D. E. Wemmer, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 7586; c) W. S. Wade, M. Mrksich, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1993**, 32, 11385.
- [3] a) J. G. Pelton, D. E. Wemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 5723; b) *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1393.
- [4] a) M. Mrksich, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2572; b) B. H. Geierstanger, T. J. Dwyer, Y. Bathini, J. W. Lown, D. E. Wemmer, *ibid.* **1993**, 115, 4474; c) M. Mrksich, P. B. Dervan, *ibid.* **1993**, 115, 9892; d) T. J. Dwyer, B. H. Geierstanger, M. Mrksich, P. B. Dervan, D. E. Wemmer, *ibid.* **1993**, 115, 9900; e) B. H. Geierstanger, J. P. Jacobsen, M. Mrksich, P. B. Dervan, D. E. Wemmer, *Biochemistry* **1994**, 33, 3055; f) M. Mrksich, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 3663; g) B. H. Geierstanger, M. Mrksich, P. B. Dervan, D. E. Wemmer, *Science* **1994**, 266, 646; h) M. Mrksich, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3325.
- [5] a) M. Mrksich, M. E. Parks, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7983; b) M. E. Parks, E. E. Baird, P. B. Dervan, *ibid.* im Druck.
- [6] E. E. Baird, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* im Druck.
- [7] Pyrrol/Imidazol-Polyamide wurden durch Festphasensynthese hergestellt [6]. Die Polyamide wurden mit Ethylendiamin von der Festphase abgespalten und durch präparative HPLC gereinigt. 1: MALDI-TOF-MS ($M + H$): gef. 1065.0, ber. 1065.1.
- [8] Die Oligonucleotide wurden von der Festphase abgespalten und mit 0.1 M NaOH (55 °C, 18 h) entschützt. Für eine andere Methode siehe A. N. Sinyakov, S. G. Lokhov, I. V. Kutyavin, H. B. Gamper, R. B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4995.
- [9] 3: MALDI-TOF-MS ($M - H$): gef. 4487, ber. 4483; 4: MALDI-TOF-MS ($M - H$): gef. 4484, ber. 4483.
- [10] Das UV-Spektrum des Polyamid-Oligonucleotids setzt sich additiv aus denen der Einzelkomponenten zusammen: λ_{max} (ε) [H_2O] = 260 nm (138000), 310 nm (54000).
- [11] Das Plasmid pCON1 wurde durch Hybridisierung von zwei komplementären Sätzen synthetischer Oligonucleotide 5'-d(CCGGGAACGTAATGACATAGCTCGCTAATGTTATTAGCTCGCTAAGGTCATTACCGGTTAAAAAAGGAAACGCTCGA)-3', 5'-d(GCGGCTCGAGCGTTTCCTTTTAAACCGTAATGACCTTAGCGAGCTAATAACATTACGAGCTAATGTCATACGTTTC)-3' und 5'-d(CGCGCTAATGACATTAAAAAGGAAACGCTCGAGCTCGTGGGCCCTAGCGTCGTAGCTAGCGTCGTCGTTAAAG)-3', 5'-(TCGACTTAAGACGACGCTAGCTACGACGCTAGGCCCCACGAGCTCGAGCGTTTCCTTTTAAATGTCATTAGC)-3' hergestellt, welche nacheinander in pUC19, das zuvor mit *Ava* I und *Sal* I gespalten wurde, ligiert wurden. Das Plasmid wurde mit *A/II* umgesetzt, am 3'-Ende markiert und mit *Fsp* I gespalten. Das 302 Basenpaare lange Restriktionsfragment wurde über nichtdenaturierende Gel-Elektrophorese isoliert und in allen hier beschriebenen Experimenten verwendet.
- [12] Quantitative Footprint-Titrationsexperimente wurden in einem Gesamtvolumen von 400 µL mit den für die Komponenten angegebenen Endkonzentrationen durchgeführt. Die Liganden wurden zu Lösungen des radioaktiv markierten Restriktionsfragments, NaCl (10 mM), Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methan(Bis-Tris) · HCl (10 mM, pH = 7.0) und Spermin (250 µM) gegeben und 24 h bei 22 °C inkubiert. Footprint-Reaktionen wurden durch Zugabe von 10 µL DNase-I-Stammlösung (2.4 Einheiten mL^{-1}) gestartet, die MgCl_2 (200 mM), CaCl_2 (200 mM), Bis-Tris · HCl (10 mM) und Glycerin (20%) enthielt. Die Reaktionen wurden nach 6 min bei 22 °C durch Zugabe von 50 µL einer Lösung aus 107 µL Wasser, 788 µL NaCl (4 M), 425 µL EDTA (0.5 M, pH = 8.0), 40 µL Kälberthymus-DNA (1 mM Basenpaare) und 40 µL Glycogen (20 mg mL^{-1}) abgebrochen. Die DNA wurde durch Zugabe von Ethanol gefällt, die Niederschläge wurden in 80% Formamid-Puffer suspendiert, auf ein denaturierendes 8%-Polyacrylamid-Elektrophoresegel aufgetragen und bei 2000 V 1 h getrennt. Die Datenanalyse wurde wie an anderer Stelle beschrieben vorgenommen [5a]. Die angegebenen Assoziationskonstanten sind jeweils über drei Titrationsexperimente gemittelte Werte.
- [13] Die durch quantitative DNase-I-Footprint-Titrationsexperimente bestimmten Gleichgewichts-Assoziationskonstanten $K_a > 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ sind untere Grenzwerte.
- [14] a) J. P. Sluka, S. J. Horvath, M. F. Bruist, M. I. Simon, P. B. Dervan, *Science* **1987**, 238, 1129; b) J. P. Sluka, S. J. Horvath, A. C. Glasgow, M. I. Simon, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1990**, 29, 6551; c) J. Feng, R. C. Johnson, R. E. Dickerson, *Science* **1994**, 263, 348.