

Neuartige DNA-Ringe mit starren tetraedrischen Spacern**

Jufang Shi und Donald E. Bergstrom*

Die chemische Synthese von Komponenten für die Aggregation supramolekularer Strukturen wird wahrscheinlich eine bedeutende Rolle auf dem Gebiet der molekularen Nanotechnologie spielen.^[1] Die Aggregation von komplexen und höchst unterschiedlichen supramolekularen Strukturen ist eine Herausforderung für synthetisch arbeitende Chemiker. Jede Komponente eines supramolekularen Aggregats muß an einer bestimmten Stelle lokalisiert sein, damit die Makromoleküle zu komplexen Funktionen auf molekularer Ebene fähig sind; daher muß jede Komponente mit Erkennungsmerkmalen ausgestattet werden, die eine Selbstorganisation kodieren. Die Assoziation der natürlichen Nucleinsäurebasen, Adenin (A) mit Uracil (U) oder Thymin (T) sowie Cytosin (C) mit Guanin (G), liefert einen genauen und wohldefinierten Code für die molekulare Erkennung. Basensequenzen der DNA und RNA lagern sich hochspezifisch unter Doppelstrangbildung zusammen. DNA und ihre Strukturanaloga sind für den Aufbau von supramolekularen Strukturen durch kodierte Selbstorganisation sehr interessant:

- 1) Die Herstellung kann mit automatischen DNA-Synthesizern einfach durchgeführt werden.
- 2) Die Basen können z.B. durch Chromophore, Fluorophore, redoxaktive Gruppen oder metallkomplexierende Liganden modifiziert werden, ohne daß die Fähigkeit zur Basenpaarung beeinflußt wird.
- 3) Die Sequenzen können so aufgebaut werden, daß sie sich an spezifische Proteine anlagern, die nach Modifikation als molekulare elektronische oder photonische Komponenten dienen könnten.
- 4) Die Selbstorganisation kann unter milden Bedingungen zu wohldefinierten Strukturen führen.

Seeman et al. haben die Fähigkeit der DNA zum Aufbau von geometrischen Körpern, z.B. eines Würfels oder eines abgestumpften Oktaeders, durch Kombination von enzymatischen und synthetischen Techniken eindrucksvoll nachgewiesen.^[2, 3] Die Polynukleotidstränge, die als Kanten und Ecken dienen, legen die Strukturen eindeutig fest. Durch geschickten Einsatz von Restriktionsenzymen und der DNA-Ligase werden vollständig geschlossene Strukturen erhalten. Potentielle Anwendungen von auf DNA basierenden Assoziaten in der Nanotechnologie sind bekannt.^[4–7]

Wir haben DNA-haltige Untereinheiten entwickelt, in denen die DNA-Fragmente als Brücken zwischen „starren“ Spacern auftreten. Diese wurden so gewählt, daß genügend Raum für eine Verknüpfung mit vier Oligonukleotiden von einem tetraedrischen Mittelpunkt aus zur Verfügung stand. Grundsätzlich könnte man die Mittelpunkte (oder Ecken) mit einer unterschiedlichen Zahl von Seitenketten konstruieren, von denen jede verschiedene Oligonukleotide enthält, um dadurch den Aufbau von definierten supramolekularen Strukturen zu steuern. Ein

ähnliches Konzept, allerdings mit kürzeren Abstandshaltern, ist kürzlich skizziert worden.^[8]

Zur Durchführung unserer Strategie wählten wir eine einfache, zweiarmige Untereinheit mit zwei *p*-(2-Hydroxyethyl)-phenylethylphenyl-Ketten, die an ein tetraedrisches C-Atom gebunden sind (Abb. 1). Wie im folgenden beschrieben wird,

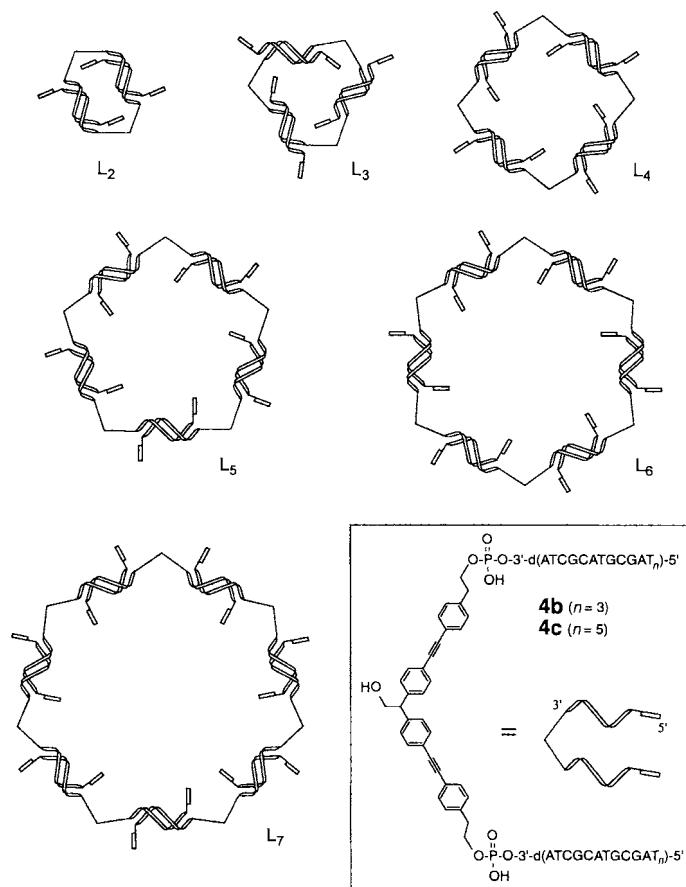


Abb. 1. Selbstorganisation von DNA-Ringen mit starrem tetraedrischem Abstandhalter, dessen Enden an in sich komplementäre Oligonukleotide gebunden sind; die nichthybridisierten Thymin-Einheiten an den 5'-Enden der Oligonukleotide sind durch Rechtecke dargestellt.

lagern sich Oligonukleotid-Konjugate infolge Hybridisierung zu diskreten, cyclischen supramolekularen Verbindungen zusammen, die durch Gelelektrophorese unter nichtdenaturierenden Bedingungen getrennt werden können. DNA-Ringe, die sich sowohl in der Struktur als auch bezüglich der Syntheseplanung erheblich von unseren unterscheiden, sind bereits synthetisiert worden.^[9–11]

Um Verbindungen mit Spacern, die jeweils zwei Oligonukleotide tragen, aufzubauen, mußte die Ausgangsverbindung an ein festes Controlled-pore-glass(CPG)-Trägermaterial gebunden werden und zwei freie aliphatische Hydroxygruppen für die Oligonukleotide aufweisen. Die Verbindung **1**,^[12] die zwei Seitenketten mit endständigen, tritylgeschützten Hydroxygruppen sowie einen dritten Arm an einem zentralen C-Atom aufweist, schien am besten geeignet. Die Substanz reagierte mit Oxalylchlorid (ein Äquivalent) zum Zwischenprodukt **2**, das *in situ* an „long chain aminoalkyl controlled pore glass“ (LCAA-CPG) gebunden wurde (Abb. 2). Eine ähnliche Synthesemethode wurde zur Herstellung basenempfindlicher Oligonukleotide genutzt.^[13]

[*] Prof. D. E. Bergstrom, J. Shi

Department of Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology
 School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue University
 West Lafayette, IN 47907-1333 (USA)
 Weitere Adresse: Walther Cancer Institute
 Indianapolis, IN 46208 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von National Institutes of Health (RO1-AI 36601) gefördert. Norman Gerry danken wir für seine Hilfe bei der HPLC-Chromatographie, der Gelelektrophorese und der Photographie.

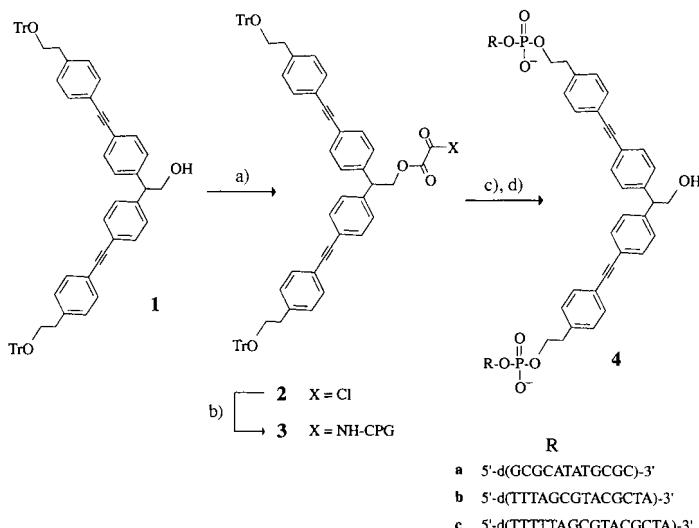


Abb. 2. Synthese der Oligonucleotide **4a–c**: a) Oxalylchlorid, Tetrazol, Py; b) CPG-NH₂; c) schrittweise Addition von Nucleosidphosphoramiditen; d) NH₄OH, 55 °C, 5 bis 8 h.

Drei Oligonucleotidsequenzen wurden an den trägergebundenen zweiarmigen Einheiten nach der Phosphoramidit-Methode mit einem DNA-Synthesizer ausgebaut. Um eine optimale Ausbeute der Oligonucleotid-Konjugate zu erhalten, wurden sowohl die Dauer der ersten Detritylierung erhöht (um eine vollständige Spaltung der stabilen Phenethyl(tritylether) zu gewährleisten) als auch die der ersten Phosphoramidit-Kupplung. In den nachfolgenden Reaktionsschritten verlief die Tritylfreisetzung gleichmäßig mit einer Ausbeute von 70% bis 95%. Die Abspaltung der Oligonucleotid-Konjugate vom Trägermaterial gelang glatt unter Standardbedingungen (siehe Experimentelles).

Zur Abspaltung der Schutzgruppen wurden die Lösungen der Oligonucleotid-Konjugate **4a–c** mit konzentrierter wässriger NH₃-Lösung erhitzt. Anschließend wurde mit H₂O verdünnt und gefriergetrocknet. Die Rohprodukte wurden durch denaturierende Polyacrylamid-Gelektrophorese (PAGE) gereinigt, wobei die gewünschten Konjugate als Hauptbanden auftraten (nachgewiesen durch UV-Photometrie oder durch Anfärben mit Ethidiumbromid); im Fall eines zweiarmigen Dodecamers (24 nt) lag die Bande gerade unterhalb der von Xylylcyanol (XC, 20% denaturierende PAGE, entsprechend einem ca. 28mers), während die Banden von zweiarmigen Tetradeca- und Hexadecameren (28 und 32 nt) oberhalb der von Xylylcyanol auftraten. Die gewünschten Banden wurden herausgeschnitten, in Wasser eluiert und mit C18-Umkehrphasen-Chromatographie oder durch Zentrifugation gereinigt. Die Strukturen der Konjugate wurden durch MALDI-TOF-MS aufgeklärt.^[14]

Durch native PAGE wurden die hybridisierten Produkte der Oligonucleotid-Konjugate charakterisiert. Die gereinigten zweiarmigen Oligonucleotide **4a–4c**, die in sich komplementär sind, bildeten Bandenmuster, die auf eine kontinuierliche Reihe von Assoziaten mit 24 bis 98 Basenpaaren zurückzuführen sind. Das Oligonucleotid **4b**, das einen dodecameren, ebenfalls in sich komplementären Abschnitt mit zwei zusätzlichen T-Basen aufweist, führte zu einem relativ gut aufgelösten Muster mit mindestens acht klar unterscheidbaren Banden (Abb. 3). Verbindung **4c** mit vier zusätzlichen T-Basen gab geringfügig verbreiterte Banden, und der Anteil des Monomers war größer als der der höheren Assoziate.

Durch Variation der Oligonucleotidkonzentration, der Temperatur, des Kations und der Ionenstärke wurden die optimalen

Hybridisierungsbedingungen ermittelt. Die besten Ergebnisse wurden mit relativ kurzen Hybridisierungszeiten (3 h) und einem Puffer aus ZnCl₂ und N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethan sulfonsäure (HEPES) erhalten. Ähnliche Ergebnisse wurden mit einem Puffer aus Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), MgCl₂ und NaCl erzielt. Eine TAE-Mg-Pufferlösung (40 mM Tris-Acetat, pH = 8.0, 20 mM NaOAc, 2 mM Ethyldiamintetraacetat (EDTA), 12.5 mM Mg (OAc)₂) wurde von anderen Autoren verwendet, um die Hybridisierung zu fördern; allerdings waren so erheblich längere Hybridisierungszeiten erforderlich, und es wurden Gele erhalten, die uneinheitliche relative Bandenintensitäten aufwiesen.^[15] Bei niedriger Pufferkonzentration war die Menge an Dimer größer als die der höheren Homologen, bei hoher Konzentration wurden weniger ausgeprägte Banden höherer Homologe beobachtet.

Längere Hybridisierungszeiten führten ebenfalls zu einer verstärkten Bildung der höheren Homologe. Die Kurven in Abbildung 4 geben für **4b** und **4c** die Abhängigkeit der Laufstrecke im Gel (Abb. 3) von der Ringgröße wider.

Die Bindung von kurzen DNA-Fragmenten an starre Kohlenwasserstoffarme induziert eine Selbstorganisation unter Bildung von DNA-Ringen (Dimer bis >Heptamer). Die Ringbildung wird durch die Ausdehnung der Oligonucleotidketten nicht behindert (z.B. **4b** mit zwei, **4c** mit vier zusätzlich freien T-Basen). Dies lässt vermuten, daß die Ringe, wenn sie erst durch kovalente Quervernetzung stabilisiert sind, als potentielle Bausteine für den Aufbau von Strukturen höherer Ordnung verwendet werden können.

Experimentelles

3: Zu einer Lösung von 1,2,4-Triazol (20 mg, 0.29 mM) in Acetonitril (1 mL) wurden 25 µL Oxalylchlorid (0.05 mM) gegeben. Es bildete sich ein Niederschlag, der nach Zugabe von Pyridin (25 µL) verschwand. Nach der Zugabe einer Lösung von 1 (48.5 mg, 0.05 mM) in Acetonitril (250 µL) und Pyridin (25 µL) wurde 1 h gerührt. Anschließend wurden 500 mg LCAA-CPG zugefügt. Man ließ die Mischung 15 min stehen, entfernte die Flüssigkeit und behandelte den Festkörper in einer Spritze nacheinander mit Acetonitril, trockenem Methanol, Acetonitril und einer 1:1-Mischung aus Dimethylaminopyridin (0.3 M) und Acetanhydrid in THF. Der nicht umgesetzte Alkohol wurde chromatographisch zurückgewonnen (Silicagel 60 PF254 versetzt mit Gips; Chromatotron, Harrison Research). Das Trägermaterial

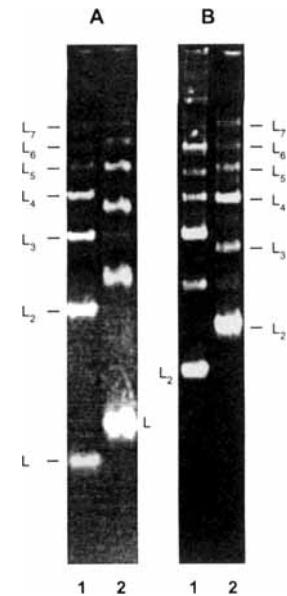


Abb. 3. Polyacrylamid-Gelektrophorese (PAGE; 20%, nativ): A Zn-Puffer, 4 °C, 3 h; B TAE-Mg-Puffer, 4 °C, 40 h; Reihe 1 und Reihe 2: Oligonucleotid-Linker-Konjugat **4b** bzw. **4c**; die Banden der Ringe L₁ bis L₇ (siehe Abb. 1) sind beschriftet.

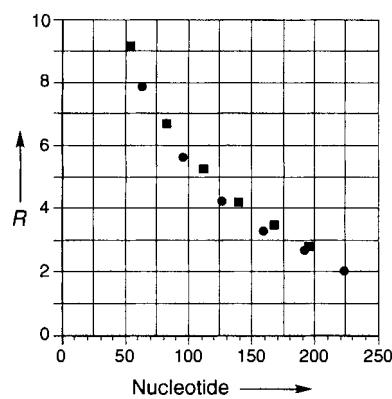


Abb. 4. Relative Laufstrecke im Gel **R** (siehe Abb. 3) aufgetragen gegen die Ringgröße für **4b** (■) und **4c** (●).

wurde mit wasserfreiem DMF und wasserfreiem Ether gewaschen, an der Luft getrocknet und in eine ABI-DNA-Synthese-Säule überführt. Die Beladung ausbeute wurde ermittelt, indem eine Standard-Oligonucleotidsynthese nach der Phosphoramidit-Methode mit dem derivatisierten CPG durchgeführt wurde. Die Kupplungsausbeuten wurden aus der Dimethoxytritylkation-Konzentration der Spülösungen der Detritylierungen berechnet; die Konzentration für die Detritylierung nach der ersten Phosphoramidit-Kupplung ergab für 7.5 mg Trägermaterial 0.95 A_{260} (30 mL Verdünnung), entsprechend einer Beladung von $54 \mu\text{mol g}^{-1}$ DMTr. Mit zwei Hydroxygruppen pro Linker beträgt die Beladung $27 \mu\text{mol g}^{-1}$. Oligonucleotidsynthese: Die Oligonucleotid-Konjugate wurden mit einem DNA-Synthesizer (Modell 381 A der Firma Applied Biosystems; 0.2 μmol Maßstab) synthetisiert. Die Reaktionszeit der Detritylierung wurde auf 4 min eingestellt, die der ersten Phosphoramidit-Kupplung auf 5 min. Die Synthesen wurden durch die quantitative UV-spektroskopische Bestimmung der Dimethoxytritylkation-Konzentration nach jeder Detritylierung überwacht.

Die Abspaltung der Oligonucleotide vom Träger wurde nach der Standardmethode (konzentrierte wäbrige NH_3 -Lösung, Raumtemperatur, 5 bis 20 min) durchgeführt. Die Abspaltung der Schutzgruppen wurde durch Erhitzen auf 55°C (5 bis 8 h) vollendet. Die Lösungen wurden anschließend mit fünfach deionisiertem H_2O verdünnt, in Trockeneis/Aceton abgekühlt und gefriergetrocknet. Die getrockneten Oligonucleotide wurden in H_2O gelöst und durch UV-Spektroskopie ($\lambda = 260 \text{ nm}$) quantitativ bestimmt. Die Reinigung erfolgte durch PAGE (15 oder 20%) unter denaturierenden Bedingungen (8.3 M Harnstoff). Anschließend wurden die Gele mit Plastikfolie bedeckt und über einer fluoreszierenden Dünnschichtchromatographie-Platte (Merck, EM-Sciences) unter Belichtung mit einer UV-Lampe photographiert. Die Oligonucleotide wurden aus dem zerkleinerten Gel mit H_2O bei Raumtemperatur extrahiert (ca. 12 h) und mit Umkehrphasen-Chromatographie (C18, SEP-PAK) oder durch Zentrifugation (Amicon Centricon-SR 3, 3000 MW) gereinigt. Die Lösungen der gereinigten Produkte wurden mit fünfach deionisiertem H_2O verdünnt, in Aliquote aufgeteilt (0.1 OD Pro Aliquot), gekühlt, gefriergetrocknet und bei -20°C im Dunkeln aufbewahrt. Die MALDI-TOF-MS-Untersuchung wurde mit einem PerSeptives-Voyager-Biospectrometry-Gerät durchgeführt. Die Proben bestanden aus 5 bis 30 pm Oligonucleotid und 0.5 μL einer Matrixlösung (0.0184 M Ammoniumcitrat, 0.0338 M Picolinsäure, 0.279 M 3-Hydroxypicolinsäure): **4b**: ber.: 9136 [M + 1], gef.: 9131 [M + 1], **4c**: ber.: 10360 [M + 1], gef.: 10360 [M + 1].

Hybridisierung und Charakterisierung der Oligonucleotid-Konjugate: Die Hybridisierung einer Lösung der Konjugate (0.05 OD) in 15 bis 30 μL Pufferlösung (Zn-Puffer: 12.5 mM ZnCl_2 , 50 mM HEPES; TMS-Puffer: 50 mM Tris, 10 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl; TAE-MG-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, 12.5 mM MgCl_2) erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen (4, 24 und 50°C) und Zeiten (10 min bis > 24 h). Der Einfluß der Konzentration auf die Hybridisierung wurde durch Auflösen von 0.05 OD Mengen der Konjugate in TAE-MG-Puffer (12.2, 36.6 und 244 μL) und gleichzeitigem Vergleich der PAGE ermittelt.

Native PAGE: Es wurden native Polyacrylamidgele gegossen (15 oder 20%, $15 \times 17 \text{ cm}$; Polymerisationszeit: 45 min bis 2 h) und vor dem Auftragen der Probe eine 30minütige Elektrophorese durchgeführt. Die Elektrophoresen der Oligonucleotide wurden 8 bis 12 h bei 8 bis 10 Vcm^{-1} Feldstärke in einem TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2.5 mM Na_2EDTA , pH = 8, mit konzentrierter HCl eingestellt) bei 4°C durchgeführt. Die Laufstrecken wurden für jede Reihe anhand einer Photographie ($7.5 \times 10 \text{ cm}$) ermittelt, die nach Ethidiumbromideinwirkung mit Durchleuchtung angefertigt worden war.

Eingegangen am 15. August 1996 [Z 9627]

Stichworte: DNA · Nucleotide · Supramolekulare Chemie

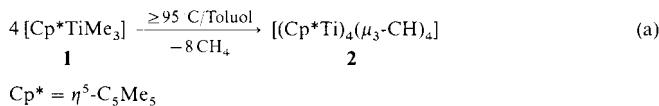
- [1] K. E. Drexler, *Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation*, Wiley, New York, 1992.
- [2] J. Chen, N. C. Seeman, *Nature* **1991**, *350*, 631.
- [3] Y. Zhang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1661.
- [4] J. B. Tucker, *High Technology* **1984**, *4*, 36.
- [5] N. C. Seeman, *Nanotechnology* **1991**, *2*, 149.
- [6] N. C. Seeman, *J. Biomol. Struct. Dynamics* **1985**, *3*, 11.
- [7] M. J. Heller, R. H. Tullis, *Nanotechnology* **1991**, *2*, 165.
- [8] S. Jordan, Dissertation, Universität Göttingen, 1993.
- [9] S. I. Rumney, E. T. Kool, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1686; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1617.
- [10] H. Gao, N. Chidamabaram, B. C. Chen, D. E. Pelham, R. Patel, R. Yang, A. Zhou, A. Cook, J. S. Cohen, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 445.
- [11] J.-H. Chen, N. R. Kallenbach, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6402.
- [12] Verbindung **1** wurde in zwei Schritten aus 2,2-Diphenylethanol durch Iodierung und anschließende Pd-katalysierte Kupplung mit *p*-(Trityoxyethyl)phenylethlen erhalten.
- [13] R. H. Alul, C. N. Singman, G. Zhang, R. L. Letsinger, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 1527.
- [14] M. C. Fitzgerald, L. M. Smith, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 117.
- [15] Y. Wang, J. E. Mueller, B. Kemper, N. C. Seeman, *Biochemistry* **1991**, *30*, 5667.

Thermische Zersetzung von $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{TiMe}_3]$: Synthese und Struktur des Methylidincubans $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{Ti}]_4(\mu_3\text{-CH})_4$ **

Román Andrés, Pilar Gómez-Sal, Ernesto de Jesús, Avelino Martín, Miguel Mena* und Carlos Yélamos

Metallorganische Verbindungen und Metallalkoxide können durch kontrollierte Thermolyse in viele nützliche Materialien von hoher Reinheit oder spezifischer Morphologie (für elektronische und optische Anwendungen), hoher mechanischer Belastbarkeit und/oder hoher thermischer Stabilität (Verwendung als Struktur- oder Refraktärmaterialien) überführt werden. Die Faktoren, die die Stabilität dieser Vorläuferverbindungen, die Art und Weise der Kohlenwasserstoffeliminierung und die bei der Umwandlung in Materialien beteiligten Schritte bestimmen, sind Gegenstand intensiver praktischer und theoretischer Untersuchungen.^[1]

Bei Studien zur Stabilität von Metall-Kohlenstoff-Bindungen in Monopentamethylcyclopentadienylmetallkomplexen von Metallen der vierten Gruppe stellten wir fest, daß die Thermolyse der dreikernigen Verbindungen $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{Ti}(\mu\text{-O})(\text{CH}_2\text{R})_3]$ ($\text{R} = \text{H}, \text{Me}$) glatt zu den $\text{d}^0\text{-}\mu_3\text{-Alkylidinderivaten } [(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{Ti}(\mu\text{-O})_3(\mu_3\text{-CR})]$ und den entsprechenden Alkanen CH_3R führt.^[2] Hier berichten wir über die Thermolyse des einkernigen Titanderivats $[(\eta_5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{TiMe}_3]$ **1**^[3] in Toluol bei $\geq 95^\circ\text{C}$, die nach Methaneliminierung in hoher Ausbeute das röntgenstrukturanalytisch charakterisierte Titanacuban $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{Ti}]_4(\mu_3\text{-CH})_4$ **2** ergab [Gl. (a)]. $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch konnten bei der Umsetzung keine Intermediate nachgewiesen werden.



Die Verbindung **2** ist ein dunkelbrauner, kristalliner Feststoff, der thermisch sehr stabil ist; in Benzol- oder Toluollösung findet auch nach mehreren Tagen bei über 200°C keine Zersetzung statt. Die Elementaranalyse und die NMR-Daten sind mit der Formel $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{Ti}(\text{CH})]$ und einer in Lösung hochsymmetrischen Struktur in Einklang. Die Methyldinprotonen ergeben im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein Singulett bei $\delta = 17.75$, und das $^{13}\text{C-NMR}$ -Signal dieser Liganden liegt mit $\delta = 490.8$ bei sehr niedrigem Feld, was für diamagnetische Verbindungen beispiellos ist. Das Infrarotspektrum enthält eine starke Absorptionsbande bei 583 cm^{-1} , die wir einer Schwingung der Metall-Methylidinkohlenstoff-Bindungen zuordnen.^[4]

Der Röntgenstrukturanalyse von Einkristallen (aus Hexanlösungen durch langsames Abkühlen erhalten) zufolge besteht die Struktur von **2** aus einem nahezu perfekten Ti_4C_4 -Würfel (Abb. 1),^[5] in dem – in Analogie zum Ti_4N_4 -Kern des Nitrids $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{Ti}]_4(\mu_3\text{-N})_4$ – sowohl die Ti-C-Ti- als auch die C-Ti-C-Winkel fast 90° betragen.^[6]

Der Ti_4C_4 -Kern von **2** weist dieselbe strukturelle Disposition auf wie das kubisch flächenzentrierte Gitter von TiC .^[7] Weiter-

[*] Dr. M. Mena, Dr. R. Andrés, Dr. P. Gómez-Sal, Dr. Ernesto de Jesús, Dr. A. Martín, Dr. C. Yélamos
Departamento de Química Inorgánica
Universidad de Alcalá
Campus Universitario, E-28871 Alcalá de Henares-Madrid (Spanien)
Telefax: Int. +1/854683
E-mail: qimena@alcala.es.

[**] Diese Arbeit wurde vom DIGICYT (PB93-0476) und von der Universidad de Alcalá unterstützt.