

beschriebenen Strukturen wurden als „supplementary publication no. CCDC-179-172“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse angefordert werden: The Director, CCDC, 12 Union Road, GB-Cambridge, CB21EZ (Telefax: Int. + 1223/336-033; E-mail: deposit@chemcrs.cam.ac.uk).

- [17] B. G. Cox, H. Schweiger, *Coordination and Transport Properties of Macrocyclic Compounds in Solution*, Elsevier, Amsterdam, 1992, S. 298–301.  
 [18] L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Tokar, I. Silman, *Science* 1991, 253, 872–879.  
 [19] a) P. C. Kearney, L. S. Mizoue, R. A. Kumpf, J. E. Forman, A. McCurdy, D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 9907–9919; b) F. Inokuchi, Y. Miyahara, T. Inazu, S. Shinkai, *Angew. Chem.* 1995, 107, 1459–1462; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 1364–1366; zit. Lit.  
 [20] Der pK-Wert für die Bildung von **4** in CH<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> beträgt 5.84 ± 0.01 (Messung von Dr. H. Inerowicz); siehe auch Zitate [13, 14] in Lit. [11].

## Stabilität und Konformationsänderung eines kleinen cyclischen Oligonucleotid-Konjugats\*\*

Mathias K. Herrlein und Robert L. Letsinger\*

Die thermische Stabilität doppelsträngiger Oligonucleotide in verdünnter wässriger Lösung kann durch Einfügen von terminalen kovalenten Linkern erhöht werden. Stilbendicarboxamid-Brücken haben sich als besonders effektiv erwiesen.<sup>[1]</sup> Um die Grenzen dieser Stabilisierung zu untersuchen, haben wir einen kleinen Oligonucleotidring synthetisiert, der die vier natürlich vorkommenden Nucleotide sowie zwei Stilbendicarboxamid-Brücken enthält (**2**). Da nur zwei Basenpaare gebildet werden können, weist dieser Nucleotidbaustein die Minimalvoraussetzung auf, um einen „Mini-DNA-Doppelstrang“ zu liefern. Gemäß der hier veröffentlichten Daten nimmt **2** in neutraler Lösung bei Raumtemperatur eine bemerkenswert stabile Konformation ein, die beim Erhitzen destabilisiert und in alkalischer Lösung in eine neue Konformation überführt wird, in der die Stilbengruppen einander angenähert sind.

Die Synthese des cyclischen Konjugats (Schema 1) basiert auf einer einfachen Ligation von Oligonucleotid-3'-phosphorothioaten und 5'-O-Tosyloligonucleotiden, die zuvor hybridisiert wurden.<sup>[2]</sup> Die Ausgangsverbindung **1** wurde nach bekanntem Verfahren synthetisiert, wobei Expedite-Reagentien (Millipore Corp.) zur Einführung von dA-, dG- und dC-Einheiten, Phosphoramidite von 5'-O-Tosylthymidin zur Addition von dT und ein geschütztes Stilbendicarboxamid-Konjugat zum Aufbau der

Brücke eingesetzt wurden.<sup>[2]</sup> In 1 M wässriger NaCl-Lösung setzt sich **1** glatt (pH = 7, 22 °C, 28 h) zu einer neuen Verbindung um, die bei der Umkehrphasen-HPLC schneller eluiert wird als **1** (Abb. 1). Gemäß Ionenaustauschchromatographie (pH = 12) ist das isolierte Produkt homogen (Einzelsignal, Retentionszeit: 23.7 min). Anhand der chromatographischen, thermischen, spektroskopischen und photochemischen Eigenschaften sowie der verwendeten Synthesemethode weisen wir diesem Produkt eine cyclische Struktur (siehe **2**) zu.

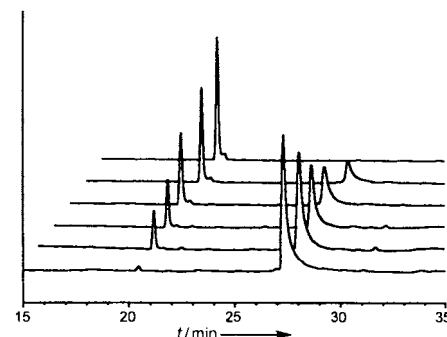
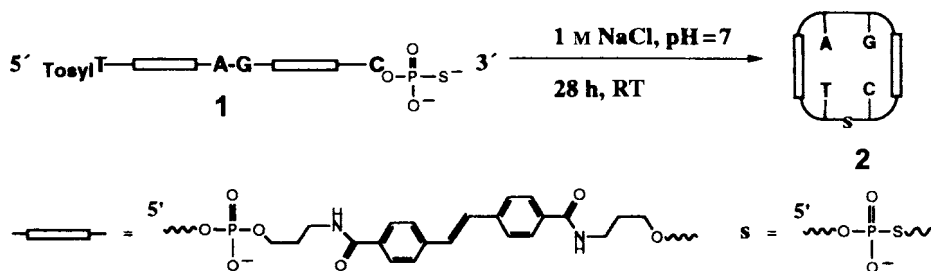


Abb. 1. Umkehrphasen-HPL-Chromatogramme von Proben der Reaktion von **1** (ca. 1.3 µM) in 1 mL wässriger Pufferlösung (pH = 7.2, 30 mM Phosphat, 1 M NaCl) bei 22 °C nach folgenden Reaktionszeiten (von vorn nach hinten): < 1 min, 3 h, 6 h, 12 h, 18 h, 28 h; Detektion bei 260 nm; Retentionszeiten von **1** und **2**: 27.3 bzw. 20.4 min.

Die erhöhte Beweglichkeit der Verbindung bei der Umkehrphasen-HPLC ist in Einklang mit der Abspaltung der Tosylgruppe und mit dem Verhalten größerer Oligonucleotidringe, die durch Ringschluß unter Substitution von Tosylat durch Phosphorothioat gebildet wurden.<sup>[2]</sup> Im Prinzip kann die Tosylatsubstitution entweder durch monomolekulare Cyclisierung von **1** zu **2** oder durch bimolekulare Reaktion unter Bildung linearer oder cyclischer Polymere stattfinden. Da bimolekulare Reaktionen von Oligonucleotidtosylaten im mikromolaren Konzentrationsbereich sehr langsam ablaufen, kann diese Reaktion für **1** ausgeschlossen werden.<sup>[3]</sup> Die monomolekulare Cyclisierung kann durch die Starrheit der Stilbendicarboxamidgruppen und möglicherweise durch Bildung eines durch Basenpaarung stabilisierten Zwischenprodukts begünstigt werden.

Eine bemerkenswerte Eigenschaft von **2** ist die hohe thermische Stabilität einer auf Basenstapelung beruhenden Konformation. Die bei 260 nm gemessene Schmelzkurve von **2** in (wässrige Lösung, 0.1 M NaCl, 30 mM Phosphat, pH = 7) steigt bei 90 °C immer noch an (geschätzte  $T_m$  > 80 °C). In 50% Ethanol, einem Lösungsmittel, das die Hybridisierung abschwächt, lag eine vollständige Schmelzkurve mit einem  $T_m$ -Wert im Bereich von 66 °C vor (Abb. 2). Die Stabilitätssteigerung dieser kleinen, auf Basenstapelung beruhenden Struktur kann auf die Stilbendicarboxamid-Brücken zurückgeführt werden, die einen Abbau an den Enden verhindern und



Schema 1. Cyclisierung eines kleinen Oligonucleotidkonjugats.

[\*] Prof. Dr. R. L. Letsinger, Dr. M. Herrlein  
 Department of Chemistry, Northwestern University  
 Evanston, IL 60208 (USA)  
 Telefax: Int. + 847/491-7713

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom National Institute of General Medical Sciences (GM10265) gefördert.

zu einer Anordnung der Nucleotide führen, durch die Wechselwirkungen begünstigt werden; zum Vergleich: Der  $T_m$ -Wert der äußerst stabilen Haarnadelstruktur, die sich beim Falten von dGCGGAAAGC in 0.1 M wässriger NaCl-Lösung bildet, beträgt 76.5 °C.<sup>[4]</sup> Sowohl die Basenstapelung in der dGGAAA-

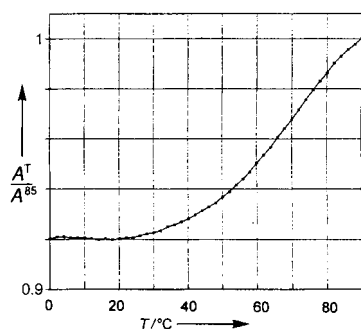


Abb. 2. Bei 260 nm gemessene Schmelzkurve von **2** (ca. 0.5 Abs<sub>260</sub> Einheiten) in 1 mL einer Pufferlösung (50% Ethanol, 0.1 M NaCl, 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan-(Tris)/HCl; pH = 7.0);  $A^T/A^{85}$  = normalisierte Absorption bei 260 nm.

Schleife als auch die der beiden terminalen dGC-Basenpaare scheinen zur Stabilität beizutragen. Stilbendicarboxamid-Brücken können als Indikator für eine Hybridisierung von Oligonucleotiden dienen.<sup>[5]</sup> Ein Oligonucleotid mit einer Stilbendicarboxamidgruppe weist eine Fluoreszenzbande mit einem Maximum bei ca. 370 nm auf, Oligonucleotide mit zwei, infolge von Hybridisierung angenäherten Stilbendicarboxamidgruppen dagegen eine Excimerbande mit  $\lambda_{\max}$  ca. 460 nm.<sup>[5]</sup> In alkalischer Lösung wird der Doppelstrang gespalten; die Stilbendicarboxamidgruppen werden dabei getrennt, und es tritt die charakteristische Fluoreszenz des einzelnen Fluorophors auf. Anders ist das Verhalten von **2**: Unter Hybridisierungsbedingungen (pH = 7) liegt für **2** die charakteristische Fluoreszenz eines einzelnen Fluorophors vor, in Gegenwart von NaOH eine Bande im Excimerbereich (Abb. 3).<sup>[6]</sup>

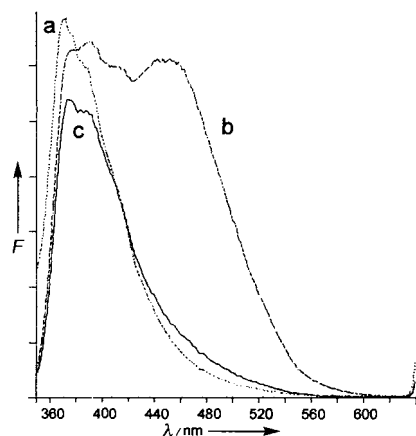
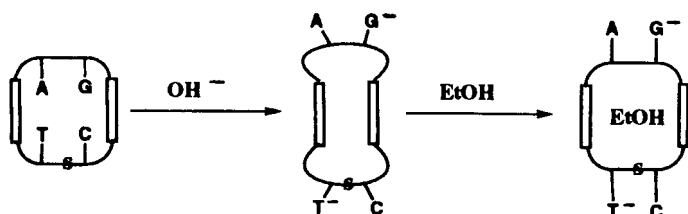


Abb. 3. Fluoreszenzspektren von **2** (0.04 Abs<sub>340</sub> Einheiten): a) in 2.5 mL Wasser, b) nach Zugabe von 100 µL 1 M NaOH-Lösung, c) nach Zugabe von 1.5 mL Ethanol zu dem unter (b) beschriebenen Gemisch.

Wir schließen daraus, daß in neutraler Lösung die Wechselwirkung der beiden Stilbendicarboxamidgruppen durch die dazwischenliegenden Basen unterbunden ist und in alkalischer Lösung eine Konformationsänderung eintritt, wodurch die Fluorophore näher zusammenrücken. Gemäß Schema 2 könnten die



Schema 2. Konformationsänderung eines cyclischen Oligonucleotids mit zwei Nucleotidpaaren und zwei Stilbendicarboxamid-Brücken.

Basen durch Deprotonierung von Thymin und/oder Guanin aus dem Ringinnern herausgedreht werden, so daß eine Annäherung der beiden Stilbendicarboxamidgruppen stattfinden kann. Nach Zugabe von Ethanol, der die Wechselwirkung organischer Chromophore in wäßriger Lösung abschwächt, tritt interessanterweise statt der Excimerbande wieder die Fluoreszenzbande der Stilbendicarboxamidgruppe auf (Abb. 3). Diese Bandenverschiebung ist wahrscheinlich auf das Einschieben von Ethanolmolekülen zwischen die beiden Stilbengruppen zurückzuführen.

Dieses Modell wird darüber hinaus durch das photochemische Verhalten von **2** gestützt. Angenäherte Stilbendicarboxamidgruppen hybridisierter Oligonucleotide photodimerisieren leicht bei Bestrahlung in Wasser.<sup>[5]</sup> Diese Reaktion verläuft beträchtlich schneller als die *trans-cis*-Isomerisierung von Einzelstrang-Konjugaten unter gleichen Bedingungen.<sup>[1]</sup> Die UV-Spektren in Abbildung 4 verdeutlichen, daß **2** in Lösung bei

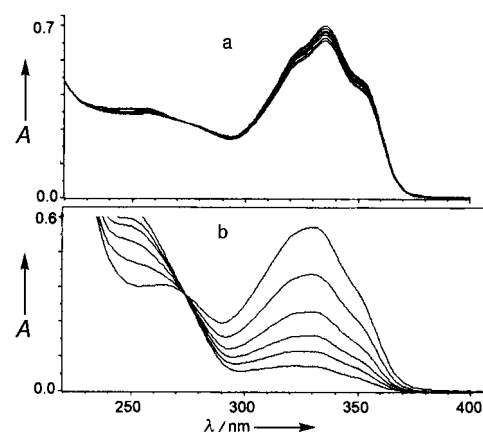


Abb. 4. a) UV-Spektren von **2** in Wasser (1 mL) nach folgenden Bestrahlungszeiten (von oben nach unten): 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 min; b) UV-Spektren von **2** in einem Gemisch aus 900 µL Wasser und 100 µL 1 M NaOH nach folgenden Bestrahlungszeiten (von oben nach unten): 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4 min.

pH = 7 relativ stabil gegen Bestrahlung ( $\lambda > 300$  nm) ist, was mit der Vorstellung in Einklang ist, daß die Chromophore durch die Basenpaare getrennt sind. Dagegen führte die Bestrahlung von **2** nach NaOH-Zugabe zu einer Absorptionsabnahme im Bereich von 300 bis 370 nm, was als Folge der Photodimerisierung angenäherter Stilbendicarboxamidgruppen zu erwarten war.

### Experimentelles

Die Oligonucleotide wurden mit einem Millipore-Expedite-8905-DNA-Synthesizer synthetisiert. Umkehrphasen-HPLC wurde an einer Hewlett-Packard-ODS-Hypersil-Säule (4.6 × 200 mm) mit 0.03 M Triethylammoniumacetat (pH = 7.0) und einem Gradienten aus CH<sub>3</sub>CN und 0.03 M wäßriger Triethylammoniumacetat-Lösung im Verhältnis 95:5 (1% min<sup>-1</sup>) durchgeführt; Durchflußgeschwindigkeit: 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Die Ionenaustauschchromatographie erfolgte an einer Dionex-Nucleo-Pak-NA-100-Säule in 10 mM wäßriger NaOH mit einem Gradienten aus 1.0 M NaCl und 10 mM NaOH (2.0% min<sup>-1</sup>); Durchflußgeschwindigkeit: 1.5 mL min<sup>-1</sup>. Die Schmelzkurven wurden mit einem Perkin-Elmer-Lambda-2-UV/Vis-Spektrometer aufgenommen. Die Absorptionsänderung bei 260 nm wurde bei einer Temperaturerhöhung von 1 °C min<sup>-1</sup> aufgezeichnet. Die Fluoreszenzspektren wurden bei 20 °C mit einem Perkin-Elmer-LS-50B-Spektrofluorimeter erhalten. Bestrahlt wurde in einem Rayonet-Reaktor mit zwei 350 nm-Lampen.

Eingegangen am 16. September 1996 [Z9555]

**Stichworte:** Biochemie · Cyclisierungen · Konformation · Oligonucleotide

- [1] R. L. Letsinger, T. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7323–7328.
- [2] M. K. Herrlein, J. S. Nelson, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10151–10152.
- [3] Zum Vergleich: 5'-O-Tosyl-dT<sub>8</sub>OP(O)(OH)S<sup>-</sup> ergab in wäßriger Lösung nach 16 h keine Reaktion.
- [4] I. Hirao, Y. Nishimura, Y. Tagawa, K. Watanabe, K. Miura, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3891–3896.
- [5] a) R. L. Letsinger, T. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 811–812; b) F. D. Lewis, T. Wu, E. L. Burch, D. M. Bassani, J.-S. Yang, S. Schneider, W. Jäger, R. L. Letsinger, *ibid.* **1995**, *117*, 8785–8792.
- [6] Dieses Ergebnis ist in Einklang mit der cyclischen Struktur **2** und nicht mit einem cyclischen Dimer, das zwei angenäherte Stilbengruppen in der Basenstapelkonformation und deshalb Excimer-Fluoreszenz aufweist.

## Durch Metallionen geprägte Polymere: Synthese und Strukturen von *N*-(4-Vinylbenzyl)-1,4,7-triazacyclononan-Zink(II)-Komplexen, deren Copolymerisation mit Divinylbenzol und Metallionenselektivitätsstudien mit den entmetallierten Harzen – Belege für eine Sandwichkomplexierung in der Polymermatrix\*\*

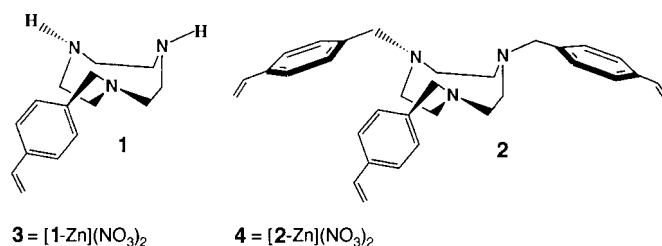
Hong Chen, Marilyn M. Olmstead, Robert L. Albright, Jozsef Devenyi und Richard H. Fish\*

Auf die innovativen Arbeiten von Wulff, Mosbach, Shea und anderen<sup>[1]</sup> geht das Konzept geprägter Polymere zurück, bei dem von einem Vinylmonomer als Wirt und einem als Templat dienenden Gastmolekül ausgegangen wird. Diese Wirt-Gast-Komplexe werden dann mit einem vernetzenden Reagens polymerisiert, wobei räumlich definierte Stellen in der Polymermatrix entstehen, von denen man sich ein Erkennen des entfernbaren Gastmoleküls bei Wiedereinführungsexperimenten erhofft. Als Template wurden in diesem eleganten Ansatz zur hochselektiven Synthese von Polymeren mit definierter Form unter anderem Metallionen verwendet.<sup>[2]</sup> Allerdings ist durch Metallionen geprägten Polymeren viel weniger Aufmerksamkeit zuteil geworden als durch organische Verbindungen geprägten. So interessierten beispielsweise 1) die genauen Strukturen der Vinylmonomer-Metallion-Komplexe, 2) die die Polymerisation beeinflussenden Größen wie die Art des Metallions, die Monomerstruktur und die Art des vernetzenden Reagens, 3) die Strukturen der das Templat-Ion enthaltenden Polymerbindungsstellen sowie 4) ob die Selektivität in nachfolgenden Reaktionen eine Folge der Metallionen-Erkennung oder der thermodynamischen Stabilität des Komplexes aus polymerem Ligand und Metallion ist.

Wir haben kürzlich ein umweltchemisch orientiertes anorganisch-chemisches Programm entwickelt, in dem wir uns auf polymergebundene Liganden konzentrierten, die für die selektive

Metallionenkomplexierung anhand biomimetischer Konzepte oder des Wissens über spezifische Heteroatome ausgewählt wurden.<sup>[3]</sup> Dabei konnten wir erfolgreich modifizierte, mit 6% Divinylbenzol vernetzte Polystyrolperlen herstellen, an denen Liganden verankert waren, die eine Reihe von Metallionen selektiv aus einer wäßrigen Lösung entfernten. Ein wichtiges Ziel unseres Programms war es, Polymere zu entwickeln, die selektiv bestimmte zweiwertige Metallionen wie Cu<sup>2+</sup> in Gegenwart dreiwertiger Metallionen wie Fe<sup>3+</sup> – ein in vielen unserer Umwelt entstammenden wäßrigen Lösungen enthaltenes Ion – erkennen. Hier berichten wir über ein neuartiges, hochselektives System, das den bekannten 1,4,7-Triazacyclononan(TACN)-Liganden<sup>[4]</sup> enthält und das Cu<sup>2+</sup>-Ionen in Gegenwart von Fe<sup>3+</sup>-, Co<sup>2+</sup>-, Ni<sup>2+</sup>-, Zn<sup>2+</sup>- und Mn<sup>2+</sup>-Ionen selektiv bindet.

Die 4-Vinylbenzyl-substituierten TACN-Liganden **1** und **2** entstanden glatt und in hohen Ausbeuten beim Umsetzen von 4-Vinylbenzylchlorid mit TACN und wurden durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie, FAB-Massenspektrometrie und Elementaranalysen charakterisiert (siehe *Experimentelles*). Die Zn<sup>2+</sup>-Komplexe **3** und **4** wurden aus Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und **1** bzw. **2** in Methanol erhalten; von **4** wurde die Struktur röntgenographisch bestimmt (Abb. 1).<sup>[5]</sup> Wichtige Merkmale dieser Struktur sind die verzerrt



oktaedrische Umgebung des Zn<sup>2+</sup>-Ions und die Koordination durch ein Nitrat-Ion und ein Methanolkörmolekül, die offensichtlich die Bildung eines denkbaren Sandwichkomplexes aus zwei Liganden **2** und einem Zn<sup>2+</sup>-Ion verhindern. Wir nehmen für den Komplex **3** aufgrund analytischer und spektroskopischer Befunde eine ähnliche Struktur wie für **4** an. Auch in Lösung sollten **3** und **4** nach FAB-MS-Ergebnissen als 1:1-Komplexe aus dem TACN-Liganden und Zn<sup>2+</sup> vorliegen.

Die Copolymerisation von **3** oder **4** mit 80% Divinylbenzol (DVB) und mit AIBN als Initiator lieferte die hochvernetzten, makroporösen Polymere **5** bzw. **6**, die ein 1:DVB- bzw. ein

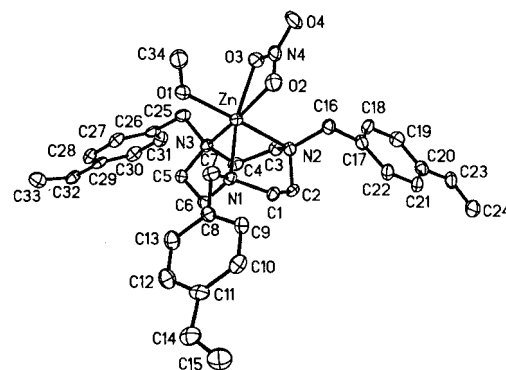


Abb. 1. Struktur von **4** im Kristall (das nichtkoordinierende NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ion wurde weggelassen). Ausgewählte Bindungslängen [Å] und -winkel [°]: Zn-N1 2.128(4), Zn-N2 2.227(4), Zn-N3 2.094(4), Zn-O1 2.109(4), Zn-O2 2.150(4), Zn-O3 2.193(4), O2-N4 1.268(6), O3-N4 1.269(6), O4-N4 1.232(6); N1-Zn-N2 82.8(2), N1-Zn-N3 86.9(2), N2-Zn-N3 84.4(2).

[\*] Dr. R. H. Fish, Dr. H. Chen, Dr. R. L. Albright, Dr. J. Devenyi  
Lawrence Berkeley National Laboratory, University of California  
Berkeley, CA 94720 (USA)  
Telefax: Int. + 510/486-5401  
E-mail: rhfish@lbl.gov  
Dr. M. M. Olmstead  
Department of Chemistry, University of California  
Davis, CA 95616 (USA)

[\*\*] Die Arbeiten am LBNL wurden von folgenden Einrichtungen unterstützt: Office of Environmental Management, Office of Science and Technology, Office of Technology Systems, U. S. Department of Energy (Efficient Separations and Processing Cross Cutting Program, Vertragsnummer DE-ACO3-76SF00098).