

Einhaltung moderater Hybridisierungstemperaturen. Die RNA **4** bildet bei diesen Temperaturen Sekundärstrukturen mit ähnlicher Stabilität ($\Delta G \approx -44.6 \text{ kcal mol}^{-1}$) wie die Oligonucleotid-Doppelhelices^[10] ($\Delta G = -34.2$ bis $-44.7 \text{ kcal mol}^{-1}$). Dadurch wird die thermodynamische Stabilität der binären Aggregate **5** je nach Sequenz unterschiedlich stark beeinflußt. Versuche mit geänderten Aggregationszeiten und -temperaturen lassen darauf schließen, daß sich das System unter den angegebenen Bedingungen im thermodynamischen Gleichgewicht befindet. Der Einfluß durch Helfer-Oligonucleotide hängt somit nicht nur von der Basensequenz, sondern auch von der Zahl der DNA-STV-Hybride ab. Während die Bildung binärer Aggregate je nach Sequenz durch Helfer-Oligonucleotide positionsabhängig (z.B. bei **5[d]**, **5[e]**) bis etwa zum 20fachen erhöht wird, zeigt der Vergleich ternärer Aggregate – abhängig von den verwendeten Bausteinen – eine bis zu dreifach höhere Signalintensität. Diese Steigerungsraten sind in Einklang mit der berechneten Sekundärstruktur von **4**, wonach insbesondere der Sequenzabschnitt d'-e'-f' als stabile doppelhelicale Domäne vorliegt. Bei Aggregaten mit vier und mehr Proteinkomponenten wird kaum eine Steigerung erreicht.

- [14] Das Protein mißt ca. $4 \times 4.2 \times 5.6 \text{ nm}$, die vier Biotin-Bindungszentren im Inneren des Moleküls bilden einen verzerrten Tetraeder mit einer mittleren Kantenlänge von ca. 2.3 nm ; P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science* **1989**, *243*, 85. Die Markierung von Avidin mit ähnlichen Goldclustern (1 nm) ergab einen Abstand von ca. 2 nm zwischen den Biotin-Bindungstellen; D. E. Safer, J. Hainfeld, J. S. Wall, J. E. Reardon, *Science* **1982**, *218*, 290.

Oligomere mit intercalierenden Cytosin-Cytosin⁺-Basenpaaren und Peptidrückgrat: Analoga des DNA-i-Motivs**

Ulf Diederichsen*

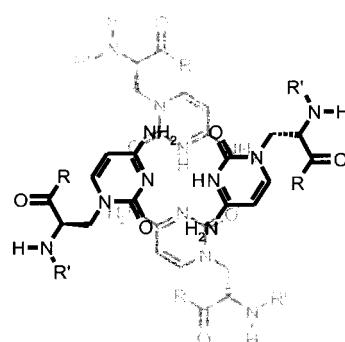
Die Enden von Chromosomen werden von telomerer DNA gebildet, die aus einem Guanin-reichen Strang sowie der komplementären Cytosin-reichen DNA in bis zu 1000 Wiederholungssequenzen besteht.^[1] Die Organisation des Guanin-reichen Stranges in Tetraden ist ein bekanntes Strukturmotiv, in dem das Donor/Acceptor-Muster des Guanins eine gleichzeitige Paarung über die Watson-Crick- und die Hoogsteen-Seite erlaubt.^[2] Unerwartet war hingegen, daß auch Cytosin-reiche Oligomere Tetraden bilden, da Pyrimidine keine Hoogsteen-Seite aufweisen und grundsätzlich einen kleineren Beitrag zur Stabilität durch Basenstapelung beisteuern. Durch Semiprotonierung eines C-C-Basenpaares bei pH 4.5–6.5 kann jedoch eine dreizähnige Paarung im reversen Watson-Crick-Modus unter paralleler Anordnung der DNA-Stränge verwirklicht und durch Intercalation von zwei C-C⁺-paarenden Doppelsträngen weitere Stabilisierung in einer C-Tetrade erreicht werden.^[3–5]

[*] Dr. U. Diederichsen

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching
Fax: (+49) 89-2891-3210
E-mail: ud@linda.org.chemie.tu-muenchen.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Di 542 2-1, Di 542 3-1), vom Fonds der Chemischen Industrie und von der Leonhard-Lorenz-Stiftung gefördert. Ich danke Herrn Professor H. Kessler, Garching, für seine Unterstützung.

Die Wechselwirkung der Basenpaarebenen beruht lediglich auf einer Wechselwirkung der Carbonyl- und Aminogruppen, die mit entgegengerichtetem Dipol übereinander zu liegen kommen (Schema 1). Diese Anordnung der Basenpaare

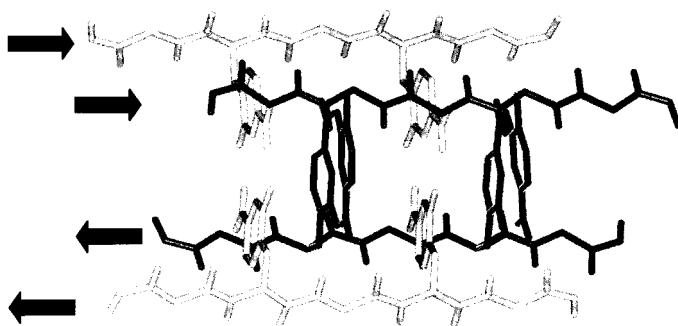


Schema 1. Benachbarte C-C⁺-Basenpaarebenen in einer dem DNA-i-Motiv analogen Alanyl-PNA-Tetrade.

leistet einen erheblichen Beitrag zur Stabilisierung, der sich in einem Basenpaarabstand von nur 3.1 \AA äußert. Derartige C-C⁺-DNA-Tetramere werden in Anlehnung an die Intercalation zweier Doppelstränge als i-Motiv bezeichnet und wurden von Gehring et al. in einer NMR-Strukturanalyse des DNA-Oligomers d(TCCCC)^[3] und von Chen et al. basierend auf einer Kristallstruktur von d(C₄) beschrieben.^[4] Inzwischen sind die C-Tetraden aus intercalierenden C-C⁺-Doppelsträngen als DNA-Strukturmotiv etabliert.^[5] Die Intercalation erfordert ein Aufwinden der Doppelhelix und führt beim i-Motiv zu einer Helicität von nur 12.4° – 16° . Die Cytosin-Cytosin-Selbstpaarung hat uns im Rahmen unserer Untersuchung von Alanyl-PNA^[6] besonders interessiert, da die fast bis zur Linearität gestreckte Rückgratstruktur im i-Motiv für Alanyl-PNA eine analoge Struktur erwarten ließ.

Alanyl-PNA besteht aus einem regulären, alternierend konfigurierten Peptidrückgrat aus Alanylseinheiten mit Nucleobasen in β -Position und paart in Doppelsträngen mit gestrecktem Rückgrat. Die Linearität der Alanyl-PNA-Paarungskomplexe ist strukturimmanent, da der Abstand aufeinanderfolgender Seitenketten dem DNA-Stapelungsabstand von 3.4 \AA sehr nahe kommt. Die Alternanz der Nucleoaminoäure-Konfiguration ist erforderlich, um die Nucleobasen auf einer Seite des Rückgrats zu orientieren.

Zur Untersuchung der C-C-Paarung haben wir die Oktamere H-(AlaC-AlaC)₄-Lys-NH₂ **1** und H-(AlaC-AlaC)₄Lys-NH₂ *ent*-**1** (AlaC=β-(Cytosin-1-yl)alanin, *d*-konfigurierte Aminosäuren sind unterstrichen; Lysinamid wurde C-terminal aus Löslichkeitsgründen eingeführt) synthetisiert,^[7] bei denen der Abstand der Nucleobasen keine Intercalation zuläßt und weiteres Strecken des Doppelstranges nicht möglich ist. Hingegen erlaubt bei den Oligomeren H-(Gly-AlaC)₄-Lys-NH₂ **2** und H-(Gly-AlaC)₄Lys-NH₂ *ent*-**2** das in jeder zweiten Einheit vorhandene Glycin räumlich die Intercalation linearer Doppelstränge (Schema 2). Die Synthese der Oligomere in jeweils beiden enantiomeren Formen war erforderlich, da aufgrund der Paarungsselektivität von Alanyl-PNA der für die C-C-Paarung einzige mögliche reverse Watson-Crick-Modus nur mit antiparalleler Strangorientie-



Schema 2. Ausschnitt aus dem Alanyl-PNA-Paarungskomplex: H-(Gly-AlaC)₄-Lys-NH₂ **2** und H-(Gly-AlaC)₄-Lys-NH₂ *ent*-**2** paaren in jeweils intercalierenden, antiparallelen Doppelsträngen.

rung und heterochiralen, miteinander paarenden Nucleoaminoäuren oder parallel mit homochiralen Nucleoaminoäure-Basenpaaren erreicht werden kann.^[6]

Die mögliche Bildung von Paarungskomplexen und deren Stabilität haben wir durch temperaturabhängige UV-Spektroskopie ermittelt, bei der das kooperative Entpaaren anhand eines sigmoiden Anstiegs der Absorption (Hyperchromie) erkennbar ist. Die Selbstpaarung der Oligomere **1**, *ent*-**1**, **2** und *ent*-**2** wurde ebenso wie die Paarung der äquimolaren Mischungen der enantiomeren Sequenzen **1** + *ent*-**1** sowie **2** + *ent*-**2** jeweils bei pH 7 (100 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄/H₃PO₄) und pH 4.5 (100 mM NaCl, 80 mM Tris-Acetat) untersucht.^[8] Bei pH 7 wurden – ganz in Übereinstimmung mit den übrigen Pyrimidin-Pyrimidin-Kombinationen in Alanyl-PNA^[6] – in keinem Fall Hinweise auf Paarung erhalten. Dies galt auch für die antiparalel möglichen Selbstpaarungen von **1** und *ent*-**1** sowie die parallele Enantiomerenpaarung **1** + *ent*-**1** bei pH 4.5. Acht C-C⁺-Basenpaare mit je drei Wasserstoffbrückenbindungen reichen demnach nicht aus, um einen Doppelstrang zu bilden. Erst wenn Intercalation der antiparalel C-C⁺-paarenden Doppelstränge **2** und *ent*-**2** ermöglicht wurde, registrierten wir einen stabilen Paarungskomplex ($T_m = 34^\circ\text{C}$, 17% Hyperchromie, je 14 μM ; Abb. 1a). Die Komplexbildung verlief reversibel mit Hysterese und war konzentrationsabhängig. Unterhalb einer Oligomerkonzentration von je 10 μM blieb die Paarung jedoch aus. Es wurde keine Selbstpaarung von **2** oder *ent*-**2** gefunden, da diese eine parallele Doppelstrangorientierung erfordern würde, die sich allgemein als ungünstig für Alanyl-PNA erwiesen hat.^[9] Der Alanyl-PNA-Tetraplex **2** + *ent*-**2** ist stabiler als das DNA-i-Motiv; unter gleichen Bedingungen wurde für das Tetramer d(C₄) ein Schmelzpunkt $T_m = 23^\circ\text{C}$ (30% Hyperchromie, je 14 μM) und für das Hexamer d(C₆) $T_m = 48^\circ\text{C}$ (35% Hyperchromie, je 11 μM) ermittelt (nicht abgebildet).

Das Ausbleiben einer Paarung von **1** im Doppelstrang mit acht C-C⁺-Paarungen bei hoher Stabilität des Paarungskomplexes **2** + *ent*-**2** legt nahe, daß dieser – ganz analog dem DNA-i-Motiv – durch zwei intercalierende, auf je vier C-C⁺-Paarungen beruhende Doppelstränge stabilisiert wird. Die besondere Anordnung der semiprotonierten Basenpaare unter entgegengesetzter Dipolorientierung der exocyclischen Amino- und Carbonylgruppen scheint den entscheidenden Unterschied im Paarungsverhalten von C-C⁺-Doppel- und

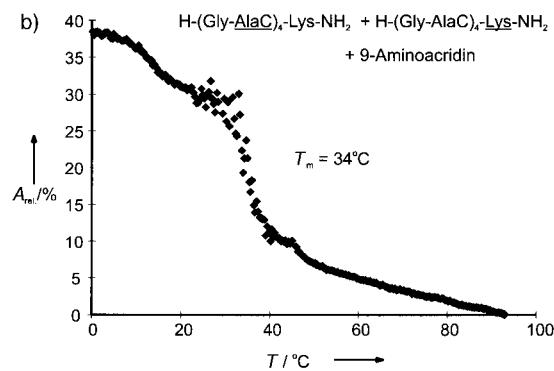
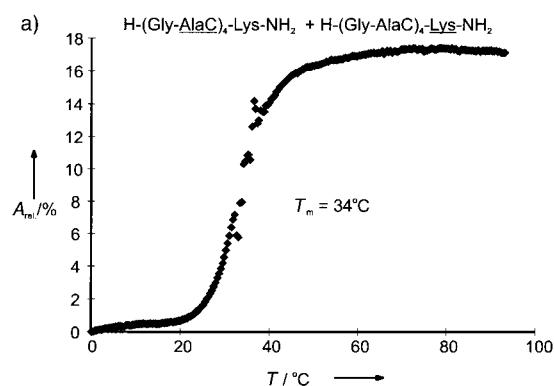
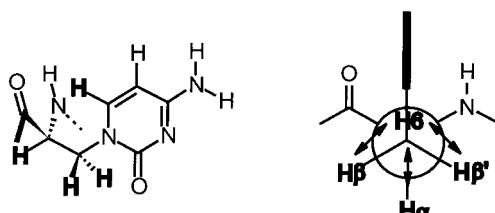


Abb. 1. Schmelzkurven a) einer äquimolaren Mischung aus den Enantiomeren **2** und *ent*-**2** (jeweils 14 μM **2** und *ent*-**2**, 100 mM NaCl, 80 mM Tris-Acetat, pH 4.5, 260 nm) sowie b) des Paarungskomplexes **2** + *ent*-**2** in Gegenwart von 9-Aminoacridin (jeweils 15 μM **2** und *ent*-**2**, 150 μM Acridin, 100 mM NaCl, 80 mM Tris-Acetat, pH 4.5, 260 nm).

Tetramersträngen auszumachen. Anders als beim i-Motiv sind bei Alanyl-PNA die jeweils miteinander paarenden Stränge antiparallel orientiert. Außerdem können hinsichtlich der Gesamtladung C-C⁺-paarender Oligomere drei Fälle unterschieden werden: Während das DNA-i-Motiv eine negative Nettoladung aufweist, handelt es sich bei einem selbstpaarenden DNA-Dimer, das eine Ethylen-Verbrückung der Positionen 3' und 5' enthält, um eine neutrale Spezies^[10] und bei Alanyl-PNA **2** + *ent*-**2** um einen Komplex mit positiver Gesamtladung.

Ein weiterer Hinweis auf die tetramere Organisation von **2** + *ent*-**2** wurde durch Gelfiltrations-HPLC (Pharmacia Superdex-Peptide PC 3.2/30) erhalten. Eluieren mit einer wäßrigen Pufferlösung (100 mM NaCl, 80 mM Tris-Acetat, pH 4.5, Fluß: 0.1 mL min⁻¹) ergab neben der mit dem Monomer korrelierbaren Spezies (19 min) eine kleine zweite Bande bei 8.6 min, die wir dem Tetramer zuordnen. In 2D-NMR-Experimenten mit dem Komplex **2** + *ent*-**2** (500 MHz, D₂O, je 2 mM, 100 mM NaCl, 80 mM Tris-Acetat) war lediglich das Spinsystem von einem Oligomer zu erkennen, was angesichts eines symmetrischen Tetramers den Erwartungen entspricht. Ferner konnte anhand von ROESY-Kreuzsignalen zwischen den Protonen an C6 (H6) der Nucleobasen und den H β -Protonen sowie H α der eigenen Nucleoaminoäure qualitativ auf eine Konformation geschlossen werden, in der die Nucleobase antiperiplanar zu H α mit H6 in Richtung des Rückgrats orientiert ist (Schema 3).



Schema 3. Wahrscheinliche Vorzugskonformation der Nucleoaminoäuren im Paarungskomplex **2 + ent-2**. Die ROEs (ROE = rotating frame Overhauser enhancement) zwischen H₆ und H_α, H_β sowie H_{γ'} sind mit Pfeilen markiert.

Bei Aufnahme der UV-Schmelzkurve von **2 + ent-2** in Gegenwart von 10 Äquivalenten 9-Aminoacridin registrierten wir beim Entpaaren des Tetramers einen hypochromen Effekt ($T_m = 34^\circ\text{C}$, etwa 25 % Hypochromie, reversibel mit Hysterese, je $15 \mu\text{M}$ Alanyl-PNA, $150 \mu\text{M}$ Acridin; Abb. 1b), der eine Assoziation des Acridins am Einzel- oder Doppelstrang nahelegt, ähnlich wie für das DNA-Dimer d(AC) beschrieben.^[11] Auf die Schmelzkurve von DNA d(C₄) unter den entsprechenden Bedingungen hat die Zugabe von 9-Aminoacridin keinen Einfluß.

Die Identifizierung eines dem DNA-i-Motiv analogen Alanyl-PNA-Tetramers konnte aufgrund der nahezu linearen Rückgratstruktur, die ein Charakteristikum der Alanyl-PNA ist, erwartet werden. Sie ist die einzige Ausnahme einer Pyrimidin-Pyrimidin-Paarung in der Alanyl-PNA-Reihe. Da das i-Motiv bei RNA nicht auftritt, wurde der Einfluß des Zuckers und der internucleotidischen Verknüpfung als wichtig für die Stabilität des i-Motivs angenommen.^[12] Durch den hier vorgestellten Alanyl-PNA-Komplex wurde gezeigt, daß dieses Paarungsmuster nicht auf Nucleinsäuren beschränkt ist. Die Bedeutung des im i-Motiv auftretenden Basenstapelungsmusters konnte als Voraussetzung für die Bildung des Tetramers erkannt werden.

Eingegangen am 4. März 1998 [Z11550]

Stichwörter: Basenstapelung • DNA • Intercalierungen • Peptidnucleinsäuren

- [1] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim, 1994.
- [2] a) C. Kang, X. Zhang, R. Ratliff, R. Moysis, A. Rich, *Nature* **1992**, 356, 126; b) F. W. Smith, J. Feigon, *Nature* **1992**, 356, 164; c) P. Schultze, F. W. Smith, J. Feigon, *Structure* **1994**, 2, 221.
- [3] K. Gehring, J.-L. Leroy, M. Guérion, *Nature* **1993**, 363, 561.
- [4] L. Chen, L. Cai, X. Zhang, A. Rich, *Biochemistry* **1994**, 33, 13540.
- [5] a) J. L. Leroy, K. Gehring, A. Kettani, M. Guérion, *Biochemistry* **1993**, 32, 6019; b) J.-L. Leroy, M. Guérion, J.-L. Mergny, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 1600; c) C. Kang, I. Berger, C. Lockshin, R. Ratliff, R. Moysis, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 11636; d) S. Ahmed, A. Kintanar, E. Henderson, *Nature Struct. Biol.* **1994**, 1, 83; e) I. Berger, C. Kang, A. Fredian, R. Ratliff, R. Moysis, A. Rich, *Nature Struct. Biol.* **1995**, 2, 416; f) J.-L. Leroy, M. Guérion, *Nature Struct.* **1995**, 3, 101; g) I. Berger, M. Egli, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 12116.
- [6] a) U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 458; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 445; b) U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1966; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1886; c) U. Diederichsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 1743; d) U. Diederichsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 145.
- [7] Zur Synthese der Nucleoaminoäure Boc-AlaC(Z)-OH (Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Z = Benzyloxycarbonyl) durch nucleophile Ring-

öffnung von Boc-Serinlacton mit *N*4-Benzylloxycarbonylcytosin siehe Lit. [6b] und: P. Lohse, B. Oberhauser, B. Oberhauser-Hofbauer, G. Baschang, A. Eschenmoser, *Croat. Chem. Acta* **1996**, 69, 535. Die Oligomerisierung wurde durch Festphasenpeptidsynthese an einem mit L- oder D-Lysin(Z)-OH beladenen 4-Methylbenzhydrylamin-Polystyrolharz unter Aktivierung mit *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophat (HATU) in Kupplungsausbeuten > 95 % erreicht. Alle Oligomere wurden durch ¹H-NMR-Spektroskopie und ESI-Massenspektrometrie charakterisiert.

- 1:** *m/z*: 1587.4 [MH^+], 794.3 [MH_2^{2+}]; **ent-1:** *m/z*: 794.0 [MH_2^{2+}]; **2:** *m/z*: 1094.4 [MH^+], 548.1 [MH_2^{2+}]; **ent-2:** *m/z*: 1094.2 [MH^+], 548.3 [MH_2^{2+}].
- [8] Temperaturprogramm für die Aufnahme der UV-Schmelzkurven: $80^\circ\text{C} \rightarrow -2^\circ\text{C}$ (20 min) $\rightarrow -2^\circ\text{C}$ (240 min) $\rightarrow 95^\circ\text{C}$ (180 min) $\rightarrow -2^\circ\text{C}$ (180 min) $\rightarrow -2^\circ\text{C}$ (240 min) $\rightarrow 95^\circ\text{C}$ (180 min) $\rightarrow -2^\circ\text{C}$ (180 min). Die Temperatur wurde mit einem Meßfühler in der Probe bestimmt.
- [9] U. Diederichsen, unveröffentlichte Ergebnisse. Da intercalierende C-C⁺-Basenpaare einen Abstand von 3.1 \AA bevorzugen und Alanyl-PNA in der gestreckten Form einen Basenpaarabstand von 3.6 \AA aufweisen würde, muß davon ausgegangen werden, daß die Tetradre aus **2 + ent-2** den Basenpaarabstand durch Scherung oder Helicalisierung zu verringern sucht, woraus sich eine Bevorzugung der antiparallelen Strangorientierung ergibt; siehe: J. Hunziker, H.-J. Roth, M. Böhringer, A. Giger, U. Diederichsen, M. Göbel, R. Krishnan, B. Jaun, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 259.
- [10] M. Egli, P. Lubini, M. Bolli, M. Dobler, C. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 5855.
- [11] E. Westhof, M. Sundaralingam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 1852.
- [12] a) S. Robidoux, M. J. Damha, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1997**, 15, 529; b) D. Collin, K. Gehring, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4069.

Ein tricyclisches Polyamid als Rezeptor für Kohlenhydrate in organischen Medien**

Anthony P. Davis* und Richard S. Wareham

Kohlenhydrate sind wichtige^[1] und vor allem reizvolle Edukte für die supramolekulare Chemie. Ihre komplexe Struktur enthält im allgemeinen keine ionischen oder stark hydrophoben Bereiche zur Ausbildung spezifischer, starker, nicht kovalenter Wechselwirkungen.^[2] Dies ist besonders in Lösungsmitteln mit Hydroxygruppen ein Problem, da dort ein Rezeptor sein Zielmolekül (Kohlenhydrat) aus einem großen Überschuß konkurrierender Moleküle mit ähnlichen funktionellen Gruppen (Lösungsmittel) aussuchen muß. Mit Ausnahme von Systemen aus Borverbindungen, die kovalente Bindungen^[3] knüpfen, gibt es immer noch keine synthetischen Rezeptoren für Kohlenhydrate in wässriger Lösung.^[4] Von den zahlreichen publizierten Systemen, die in organischen Medien

[*] Prof. A. P. Davis, Dr. R. S. Wareham
Department of Chemistry, Trinity College
Dublin 2 (Irland)
Fax: (+353) 1-6712826
E-mail: adavis@mail.tcd.ie

[**] Diese Arbeit wurde von der Europäischen Union durch Human-Capital-and-Mobility- sowie Training-and-Mobility-Forschungsprogramme unterstützt. Wir danken Peter Ashton, University of Birmingham, für die Aufnahme der Massenspektren und Prof. C. S. Wilcox für die Möglichkeit zur Benutzung des HOSTEST-Programms, um die Bindungsuntersuchungen weiter zu analysieren.