

- [14] *Modern Pulsed and Continuous-Wave Electron Spin Resonance* (Hrsg.: L. Kevan, M. K. Bowman), Wiley, New York, **1990**.
- [15] *Electronic Materials: The Oligomer Approach* (Hrsg.: K. Müllen, G. Wegner), Wiley-VCH, Weinheim, **1997**.
- [16] a) P. G. Hamill, A. E. Yost, J. D. Sandman, *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol. Sect. A* **1992**, *211*, 339–346; b) J. S. Miller, D. T. Glatzhofer, J. C. Calabrese, A. J. Epstein, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 322–323; c) Yu. V. Korshak, T. V. Medvedeva, A. A. Ovchinnikov, V. N. Spector, *Nature (London)* **1987**, *326*, 370–372.
- [17] a) M. B. Neiman, E. G. Rozantsev, Yu. G. Mamedova, *Nature (London)* **1962**, *196*, 472–474; b) G. Sosnovsky, M. Konieczny, *Synthesis* **1976**, 735–736; c) Übersichtsartikel zur Chemie gehinderter Piperidine: M. Dagonneau, E. S. Kagan, V. I. Mikhailov, E. G. Rozantsev, V. D. Sholle, *Synthesis* **1984**, 895–916.
- [18] Röntgenstrukturanalyse von **3** bei 293 K: $C_{20}H_{38}NO_2Si$, $M_r = 352.6$, triklin, Raumgruppe $P\bar{1}$, $\rho_{ber.} = 1.056 \text{ g cm}^{-3}$, $Z = 4$, $a = 7.741(9)$, $b = 8.516(10)$, $c = 33.80(3) \text{ \AA}$, $\alpha = 91.84(8)$, $\beta = 92.46(8)$, $\gamma = 94.41(9)^\circ$, $V = 2218(4) \text{ \AA}^3$. Die Daten wurden auf einem Syntex-P21-Diffraktometer mit $Mo_K\alpha$ -Strahlung ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) und ω -Scans aufgenommen. Die Struktur wurde mit Direkten Methoden gelöst und ergab nach Verfeinerung mit dem Volle-Matrix-Vorverfahren (SHELXTL-PLUS; Schweratome anisotrop, H-Atome aufgrund stereochemischer Überlegungen lokalisiert) $R1 = 0.0663$, $wR2 = 0.1711$ für 4142 unabhängige beobachtete Reflexe und 570 Variable ($I \geq 2.0\sigma(I)$, $2.4 \leq \theta \leq 20.0^\circ$). Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-101294“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [19] A. S. Hay, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 3320–3321.
- [20] R. R. Tykwiński, M. Schreiber, R. Pérez Carlón, F. Diederich, V. Gramlich, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2249–2281.
- [21] S. Takahashi, Y. Kuroyama, K. Sonogashira, N. Hagihara, *Synthesis* **1980**, 627–630.
- [22] P. E. van Rijn, S. Mommers, R. G. Visser, H. D. Verkruissse, L. Brandsma, *Synthesis* **1981**, *116*, 459–460.
- [23] K. M. Salikhov, S. A. Dzuba, A. M. Raitsimring, *J. Magn. Reson.* **1981**, *42*, 255–276.
- [24] V. V. Kurshev, A. M. Raitsimring, Y. D. Tsvetkov, *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 441–454.
- [25] A. Abragam, *The Principles of Nuclear Magnetism*, Clarendon, Oxford, **1983**.
- [26] CVFF-Kraftfeld, Insight II (Version 95.0), Biosym Technologies, San Diego, **1995**. Anstelle von $N-O^\bullet$ wurde der Parametersatz der $N-OH$ -Gruppe für die Simulationen verwendet. Hartman et al. empfahlen als Ersatz für die Nitroxyleinheit $N-O^\bullet$ bei Simulationen die $C=O$ -Gruppe (D. Hartmann, R. Philipp, K. Schmadel, J. J. Birktoft, L. J. Banaszak, W. E. Trommer, *Biochemistry* **1991**, *30*, 2782–2790). Der Fehler in den End-End-Abständen, bedingt durch die Verwendung von $N-OH$ anstelle von $C=O$ und durch das Ausführen der Simulationen ohne Lösungsmittelmoleküle, wird jedoch durch die konformative Freiheit der Nitroxidgruppen aufgrund der sowohl axialen als äquatorialen Position der Acetylensubstituenten an den Sechsringen und durch $C(sp)-C(sp^3)$ -Bindungsrotationen mehr als ausgewogen.

Erweiterung der Bindungs- und Katalyse-eigenschaften von DNA: hochfunktionalisierte dUTP-Derivate als Substrate für thermostabile DNA-Polymerasen**

Kandasamy Sakthivel und Carlos F. Barbas III*

Nucleinsäurebibliotheken bieten außerordentliche Möglichkeiten zur Selektion neuartiger Liganden und Katalysatoren, da mit der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) Bibliotheken mit mehr als 10^{14} verschiedenen Molekülen synthetisiert und selektiert werden können. Es gibt mittlerweile viele ausgewählte Nucleinsäuren, die Proteine und niedermolekulare Verbindungen binden und eine begrenzte Zahl von Reaktionen katalysieren.^[1–3] Der katalytische und mechanistische Anwendungsbereich von Nucleinsäuren ist begrenzt, da die natürlichen Nucleotidmonomere im Vergleich zu den in der Natur vorherrschenden Biokatalysatoren, den Proteinen, nur eine sehr begrenzte Funktionalität aufweisen. Daher war man sehr daran interessiert, funktionalisierte Nucleotide, die sich für die In-vitro-Selektion eignen, zu entwickeln, in der Hoffnung, die Möglichkeiten der Nucleinsäuren zur Bindung und Katalyse zu erweitern.^[4] Funktionalisierte Nucleotidtriphosphate wurden als Substrate für RNA-Polymerasen^[4d,h] eingesetzt, und von den dabei erhaltenen RNAs wurden katalytisch aktive Spezies selektiert, deren Aktivität von der modifizierten Base^[5] abhängig ist. Wie RNA ist auch DNA in der Lage, Proteine und niedermolekulare Verbindungen zu binden und Reaktionen zu katalysieren.^[1–3] Das Fehlen der 2'-Hydroxygruppe verleiht zwar der DNA eine größere Stabilität im Vergleich zur RNA, ist aber auch für die geringere Funktionalität verantwortlich. Im Unterschied zum erfolgreichen Einsatz modifizierter Nucleotidtriphosphate beim Aufbau von RNA-Bibliotheken gibt es nur ein Desoxynucleotidtriphosphat, 5-(1-Pentinyl)-2'-desoxyuridintriphosphat, das sich als brauchbares Substrat für eine thermostabile DNA-Polymerase erwiesen hat und in einer In-vitro-Selektionsstudie eingesetzt worden ist.^[6] Die Schwierigkeiten, geeignete modifizierte Desoxynucleotidtriphosphate als Substrate thermostabiler Polymerasen für die PCR zu finden, führte zur Entwicklung neuer Methoden zur In-vitro-Selektion ohne enzymatische Amplifikation.^[7] Das größte Hindernis bei der Entwicklung neuer, funktionell modifizierter DNAs ist daher die Ermittlung der Strukturen der Substrate, die von thermostabilen Polymerasen erkannt und umgesetzt werden. Mit der systematischen Synthese und Untersuchung von Desoxyuridintriphosphat-Derivaten zeigen wir hier eine Lösung dieses

[*] Prof. C. F. Barbas III, Dr. K. Sakthivel

The Skaggs Institute for Chemical Biology
and the Department of Molecular Biology
The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Fax: (+1) 619-784-2583
E-mail: carlos@scripps.edu

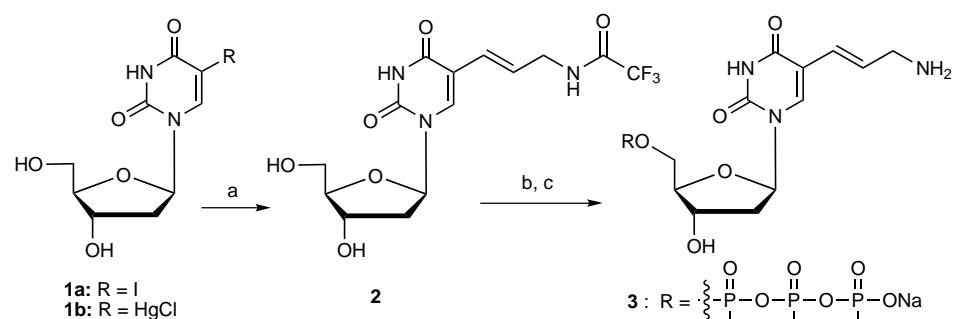
[**] Diese Arbeit wurde vom Skaggs Institute gefördert. Wir danken R. Fuller und S. Gramatikova für die technische Hilfe.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Problems und beschreiben eine neue Klasse hochfunktionalisierter Derivate, die sich für In-vitro-Selektionen modifizierter DNAs eignen.

Um zu überprüfen, welche Basenmodifikationen von den thermostabilen Polymerasen toleriert werden, synthetisierten wir zunächst 5-(3-Aminopropenyl)-2'-desoxyuridintriphosphat aus der bekannten Verbindung **2** (Schema 1). Diese stellten wir nach einer neuen Pd-katalysierten Synthesemethode aus dem käuflichen Edukt 5-Iododesoxyuridin her. Diese Methode ist der früheren, von 5-Chloromercuri-2'-desoxyuridin ausgehenden Synthese^[8] vorzuziehen, zumal nach beiden Methoden gleiche Ausbeuten erhalten wurden. Die Umwandlung von **2** in das entsprechende 5'-Triphosphat nach der Methode von Kovács und Ötvös^[9] und die anschließende Schutzgruppenabspaltung an der Aminogruppe lieferten **3**, das im 100-mg-Maßstab analytisch rein isoliert wurde (Schema 1).^[10]

Wir untersuchten die Fähigkeit von **3**, statt Desoxythymidintriphosphat (dTTP) als Substrat für thermostabile DNA-Polymerasen unter typischen PCR-Bedingungen zu fungieren. Im Handel erhältliche thermostabile DNA-Polymerasen aus vier Organismen wurden untersucht: Taq aus *Thermus aquaticus*, Vent aus *Thermococcus litoralis*, Pfu aus *Pyrococ-*



Schema 1. Synthese von 5-(3-Aminopropenyl)-2'-desoxyuridintriphosphat: a) *N*-Allyltrifluoracetamid, $\text{Na}_2[\text{PdCl}_4]$, Natriumacetatpuffer (0.1M, pH 5.2), 24 h; b) 1. POCl_3 , Trimethylphosphat, 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin (Protonenschwamm), Tri-*n*-butylammoniumpyrophosphat, Tri-*n*-butylamin; 2. NH_3 (aq.); c) Natriumperchlorat, Aceton.

cus furiosus und rTh aus *Thermus thermophilus*. Die PCR-Tests mit **3** ergaben, daß es nur von rTh-Polymerase in das aus 519 Basenpaaren bestehende Produkt eingebaut^[11] wird (Abb. 1). Eine erfolgreiche PCR mit diesem Templat erfordert den Einbau von 246 modifizierten Basen einschließlich eines Abschnitts aus acht aufeinanderfolgenden Thymidinen. Trotz dieses begrenzten Erfolgs setzten wir **3** mit drei *N*-Hydroxysuccinimidestern unter Bildung der Derivate **4a–c** um (Schema 2).

Die Verbindung **4a**, eine 4-Imidazolacrylsäure, erwies sich als hervorragendes Substrat für alle getesteten Polymerasen. Die Menge an PCR-Produkt entsprach der bei Verwendung von dTTP. Die Untersuchung der Substrate **4b** und **4c** unter Variation der Mg^{2+} -Konzentration (15–30 mM) bei entsprechender Anpassung der Substratkonzentrationen (200–800 μM) lieferte keine Anhaltspunkte für Bedingungen, unter denen diese modifizierten Basen eingebaut werden. Um das Strukturmerkmal zu identifizieren, auf das die guten Substrateigenschaften von **4a** zurückzuführen sind, synthetisier-

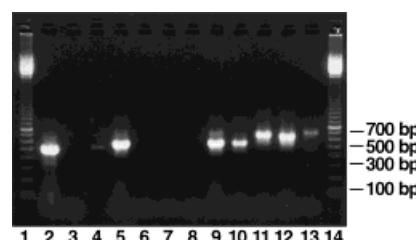
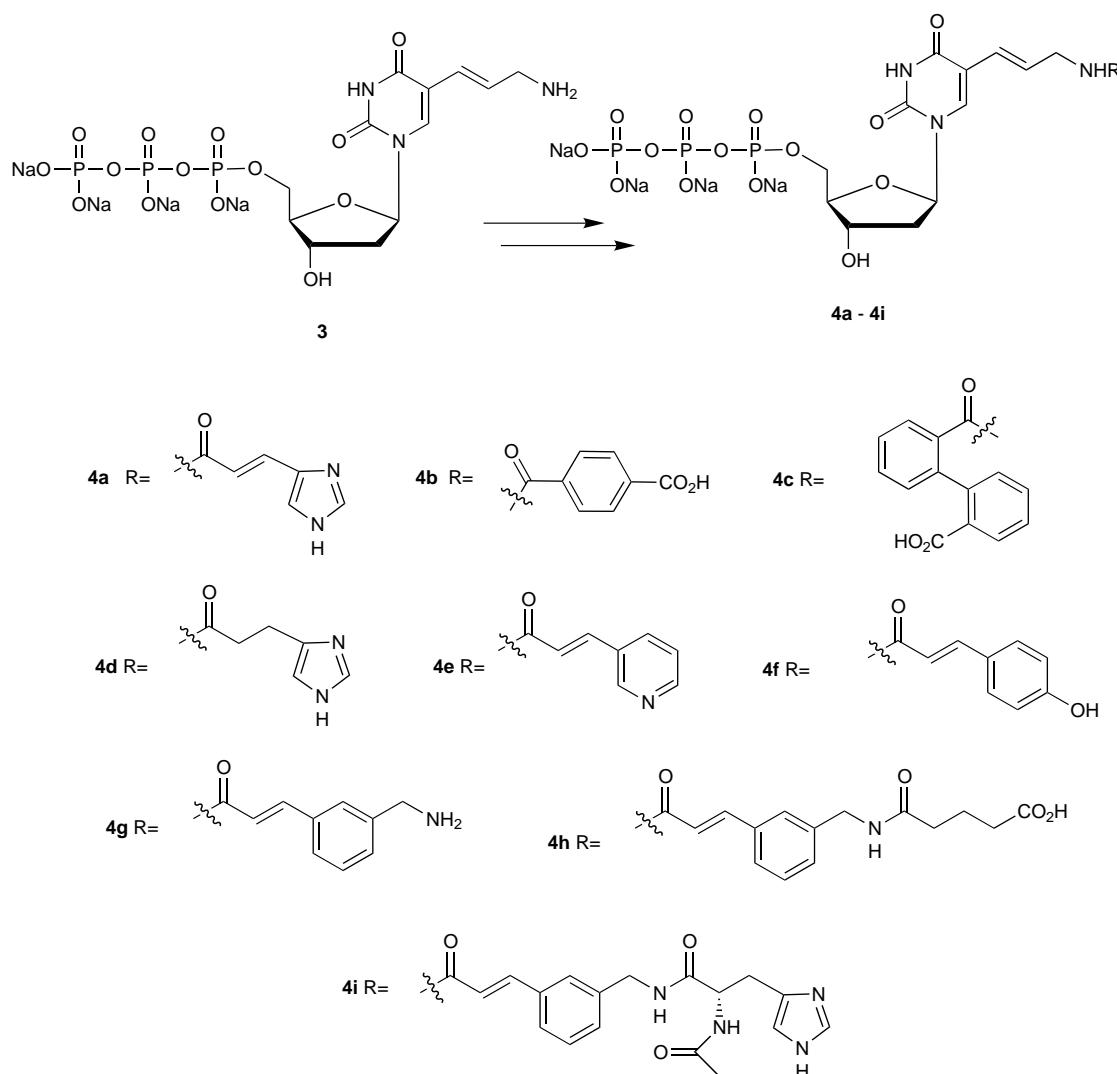


Abb. 1. PCR mit dUTP-Derivaten: 100 μL Gesamtvolumen, 1 μL (10 ng μL^{-1}) DNA-Templat pMal7CS2 (7030 bp), jeweils 1 μL (13 pmol) der Primer Malseq B (GTA AAA CGACGG CCAGTG CCA AGC) und Malseq F (GAC GCG CAG ACTAATTG AGC), 1 μL (5 U μL^{-1}) Taq-Polymerase (AmpliTaq) (nur bei den Spuren 4 und 13 wurde rTh-Polymerase verwendet), 8 μL Mischung der modifizierten dNTPs (2.5 mM von jedem Nucleotid) oder der natürlichen dNTPs (2.5 mM von jedem Nucleotid). Bedingungen: 94 °C/30 s; 30 Cycles aus 94 °C/1 min, 56 °C/1 min, 74 °C/2 min; 74 °C/10 min. Jeweils 10 μL (Spur 4: 20 μL) des PCR-Produkts wurden durch Elektrophorese (1.5% Agarosegel) analysiert und mit Ethidiumbromid detektiert. Spuren 1 und 14: Marker-DNA (100 bp); Spur 2: positive Kontrolle (dTTP+dATP+dGTP+dCTP); Spur 3: negative Kontrolle (dATP+dGTP+dCTP); Spur 4: **3**+dTTP+dGTP+dCTP; Spur 5: **4a**+dTTP+dGTP+dCTP; Spur 6: **4b**+dTTP+dGTP+dCTP; Spur 7: **4c**+dTTP+dGTP+dCTP; Spur 8: **4d**+dTTP+dGTP+dCTP; Spur 9: **4e**+dTTP+dGTP+dCTP; Spur 10: **4f**+dTTP+dGTP+dCTP; Spur 11: **4g**+dTTP+dGTP+dCTP; Spur 12: **4h**+dTTP+dGTP+dCTP; Spur 13: **4i**+dTTP+dGTP+dCTP.

ten wir **4d**, ein reduziertes Analogon von **4a**. Eine PCR mit **4d** als Substrat gelang mit keiner der Polymerasen. Wir nahmen deshalb an, daß die starre, ausladende α,β -ungesättigte Seitenkette der 4-Imidazolacrylsäuregruppe für die Eignung als Substrat verantwortlich ist. Um diese Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu testen, stellten wir die Verbindungen **4e–4g** her, die wie **4a** die α,β -ungesättigte Seitenketten enthalten (Schema 2). **4e–4g** waren für alle getesteten

Polymerasen Substrate. **4g** weist eine freie Aminogruppe auf, die eine weitere Derivatisierung ermöglicht. Durch die Synthese und die Untersuchung der Substrateigenschaften von **4h** und **4i** prüften wir die Fähigkeit von **4g**, als Templat für eine weitergehende Modifizierung zu dienen.

4h war für alle getesteten Polymerasen ein gutes Substrat, **4i** dagegen nur für die rTh-Polymerase. Den Nachweis, daß die modifizierten dUTPs wirklich in die PCR-Produkte eingebaut wurden, lieferten die beträchtlichen Änderungen der elektrophoretischen Mobilitäten der modifizierten DNA-Produkte, die sowohl auf die Massenzunahme als auch auf die Ladung der DNA-Moleküle zurückzuführen sind (Abb. 1). Es ist bemerkenswert, daß DNA, die das Analogon **4g** enthält, das bei pH-Werten um den Neutralpunkt eine positive Ladung aufweisen sollte, bei der Gelelektrophorese langsamer wandert als DNA, die **4h** enthält, das eine größere Masse und bei pH-Werten um den Neutralpunkt eine negative Ladung hat (Abb. 1). Die Bedeutung der ausladenden Seitenkette wird deutlich, wenn die Effizienz des Einbaus



Schema 2. Synthese von hochfunktionalisierten dUTPs.

von **3** und **4g**, die beide eine primäre Aminogruppe enthalten, verglichen wird. Die Verbindung mit der längeren Seitenkette, **4g**, ist im Vergleich zu **3** das stabilere Substrat. Die PCR-Produkte mit den modifizierten Basen erwiesen sich als resistent gegenüber den Restriktionsenzymen *Sac* I und *Xba* I, die die Sequenzen GAGCTC bzw. TCTAGA erkennen und natürliche DNA spalten. Die PCR-Produkte mit modifizierten dUTPs wurden kloniert und sequenziert.^[12] Die modifizierten dUTPs wurden mit der gleichen Fehlerhäufigkeit eingebaut wie dTTP in Kontrollreaktionen. Die Hauptkriterien für die Verwendung eines modifizierten dNTPs in einem In-vitro-Selektionsverfahren sind seine Fähigkeit, als Substrat für thermostabile Polymerasen zu fungieren sowie die Eignung des resultierenden Produkts als Templat für mehrere Amplifikationszyklen bei der PCR. Diese Kriterien werden von den Verbindungen **3**, **4a** und **4e-i** erfüllt. Auch Reverse Transkriptasen können in Verbindung mit der PCR bei In-vitro-Selektionsverfahren von DNA-Enzymen verwendet werden. **3** und **4a-i** testeten wir als Substrate der Reversen Transkriptase (Superscript II, Gibco/BRL) und stellten fest, daß alle Verbindungen außer **4c** und **4h** geeignet waren (siehe Hintergrundinformationen). Die Spezifität dieser Reversen

Transkriptase ist jedoch gering und sagt nichts über die Strukturanforderungen der thermostabilen Polymerasen aus. Mit dem Ziel, den katalytischen Wirkungsbereich von DNA-Molekülen zu erweitern, haben wir bei unserer Entwicklung von Substratanaloga versucht, dort funktionelle Gruppen einzuführen, die in der DNA fehlen. Die funktionellen Gruppen natürlicher Nucleinsäuren weisen pK_a -Werte auf, die weit entfernt vom neutralen pH-Wert liegen, und sind deshalb für allgemeine Säure-Base-Katalyse in diesem pH-Bereich ungeeignet.^[13] Die hier beschriebenen Substratanaloga tragen zur Lösung dieses Problems bei und bieten erweiterte Möglichkeiten für die Katalyse über kovalente Bindungen und elektrostatische Wechselwirkungen und insbesondere für die Metallionen-vermittelte Katalyse. Mit **4g** und **4h** wurden erstmals mit der PCR kationische und anionische Nucleotidanaloga in DNA eingebaut, wodurch die elektrostatischen Eigenschaften erheblich verändert wurden. Abgesehen von **4e** können die Nucleotidanaloga als funktionelle Äquivalente von Aminosäuren angesehen werden, wobei **3** und **4g** Lysin, **4a** und **4i** Histidin, **4f** Tyrosin und **4h** Asparaginsäure und Glutaminsäure entsprechen. Der erfolgreiche Einbau von L-Histidin in **4i** läßt erwarten, daß

auch andere natürliche Aminosäuren oder kurzkettige Peptide eingebaut werden können. Alle Substratanaloga ermöglichen hydrophobe Wechselwirkungen, die eine wichtige Voraussetzung sowohl für die Faltung und die Bildung von Bindungstaschen in Protein-Enzymen als auch für Änderungen der pK_a -Werte funktioneller Gruppen sind.^[14]

Wir haben hier über hochfunktionalisierte, C5-substituierte dUTP-Derivate berichtet. Diese eignen sich als Substrate für thermostabile DNA-Polymerasen und die Reverse Transkriptase und können in In-vitro-Selektionsstudien sowie beim Aufbau von DNA-Bibliotheken durch kombinatorische Synthesen verwendet werden. Wir haben allerdings nur Substrate untersucht, die die natürliche DNA-Base Thymidin ersetzen. Aufgrund der Bandbreite der Substratanaloga, die von den Polymerasen im Test erkannt und umgesetzt wurden, ist zu erwarten, daß bei Einhaltung bestimmter Strukturvorgaben auch Guanin-, Cytosin- und Adeninanaloga gefunden werden. Dadurch wäre es möglich, vier kodierte Basenaustausche in modifizierte DNA-Bibliotheken einzubauen. Dies ist zwar nicht mit den Substitutionsmöglichkeiten von 20 Aminosäuren in Protein-Bibliotheken zu vergleichen, aber eine weitergehende Funktionalisierung wäre dadurch möglich, daß bestehende DNA-Bibliotheken mit bestimmten alkylierenden oder acylierenden Reagentien umgesetzt werden. So würden zusätzliche Funktionalitäten eingeführt, wobei die chemische Reaktivität der Ziel-Desoxynucleotide von den strukturellen Gegebenheiten in ihrer Umgebung bestimmt werden. In Anbetracht der Größe von DNA-Bibliotheken, die mit der PCR synthetisiert werden können, und der Leichtigkeit, mit der sie im Labor über viele Generationen ausgebaut werden können, erwarten wir, daß modifizierte DNA künftig eine bedeutende Rolle auf Gebieten der Katalyse spielen wird, von denen man glaubte, daß sie allein den Proteinkatalysatoren vorbehalten seien.

Experimentelles

5-(3-Trifluoracetylaminopropenyl)-2'-desoxyuridin **2**: **2** wurde erstmals von Cook et al.^[8] aus 5-Chloromercuri-2'-desoxyuridin **1b** hergestellt. Wir synthetisierten **2** aus käuflichem 5-Iod-2'-desoxyuridin nach einer ähnlichen Methode: *N*-Allyl trifluoracetamid (13 g, 88 mmol) und eine Lösung von Natriumtetrachloropalladat (2.5 g in 5 mL Wasser) wurden nacheinander zu einer Suspension von 5-Iod-2'-desoxyuridin **1a** (3.5 g, 10 mmol) in einem Natriumacetatpuffer (0.1 M, pH 5.2) gegeben. Die Mischung wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert (Celite). Das Filtrat wurde eingeengt und mehrmals mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Es wurde zur Trockne eingedampft, und der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Ethylacetat als Elutionsmittel gereinigt. Ausbeute 1.7 g (44%). ¹H-NMR (CD_3OD): $\delta = 8.11$ (br.s, 1H; C-6H), 6.45 (m, 1H) und 6.16 (m, 2H; H_{vinyl} und H-1'), 4.32 (m, 1H; H-3'), 3.8 (m, 3H; H_{allyl} , H-4'), 3.75–3.60 (m, 2H; H-5', H-5''), 2.17 (m, 2H; H-2', H-2'').

5-(3-Aminopropenyl)-2'-desoxyuridintriphosphat **3**: **3** wurde nach einer bekannten Methode^[9] synthetisiert: **2** (126 mg, 0.33 mmol) und 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin (Protonenschwamm) (100 mg, 0.47 mmol) wurden in wasserfreiem Trimethylphosphat (0.75 mL) bei 0°C gerührt. Nach der Zugabe von 35 μL POCl_3 (99.9%, Aldrich) wurde die Mischung bei 0–4°C gerührt. Nach 2.5 h wurden bei 0°C eine Lösung von Tri-*n*-butylammoniumpyrophosphat in wasserfreiem DMF (0.5 M, 3 mL) und Tri-*n*-butylamin (0.3 mL) schnell hinzugegeben. Nach 1 min wurde eine wäßrige Lösung von Triethylammoniumbicarbonat (0.2 M) zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde eingeengt und der Rückstand mit wäßrigem

Ammoniak (2 mL) 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Eindampfen wurde der Rückstand an DEAE-Sephadex A-25 säulenchromatographisch unter Verwendung eines Triethylammoniumbicarbonatpuffers (0.2–0.5 M, pH 7.5) gereinigt. Die weitere Reinigung erfolgte durch Umkehrphasen-HPLC mit einem Acetonitrilgradienten (0–3%) in 50 mM Triethylammoniumbicarbonatpuffer über einen Zeitraum von 30 min. Ausbeute 110 mg (54%). ¹H-NMR (D_2O): $\delta = 8.17$ (br.s, 1H; C-6H), 6.58–6.54 (d, 1H), 6.48–6.40 (m, 1H) und 6.35 (t, 1H; H_{vinyl} und H-1'), 4.66 (m, 1H; H-3'), 4.26–4.2 (m, 3H; H-5', H-5'', H-4'); 3.70 (d, 2H; H_{allyl}), 2.41 (m, 2H; H-2', H-2''); ¹³C-NMR (D_2O): $\delta = 166.67, 153.35, 141.0, 128.74, 124.7, 114.00, 88.27, 87.90, 72.7, 67.66, 43.60, 41.98$; ³¹P-NMR (D_2O): $\delta = -9.42$ (d), -10.73 (d), -21.38 (t); Elektrospray-MS: m/z : 589 [$\text{M}+\text{H}^+$], 611 [$\text{M}+\text{Na}^+$], 633 [$\text{M}+2\text{Na}^+-2\text{H}^+$]; C,H-Analyse (%: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{Na}_4\text{O}_{14}\text{P}_3$): ber. (gef.): C 23.58 (23.75), H 2.64 (2.81), N 6.88 (7.00).

Allgemeine Synthese von **4a**, **4d**, **4e** und **4f**: Eine Mischung aus **3** (30 mg, 50 μmol) und des entsprechenden *N*-Hydroxysuccinimidesters in geringem Überschuß wurde in 0.1 M Natriumboratpuffer/DMF (1/1) 10–20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Ende der Reaktion wurde dünnenschichtchromatographisch ($\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{Isopropylalkohol}$, 2/1/1) bestimmt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch zur Trockne eingedampft. Die Reinigung der Triphosphate erfolgte durch Umkehrphasen-HPLC. Die vollständigen physikalischen Daten und Synthesen aller Verbindungen sind in den Hintergrundinformationen enthalten.

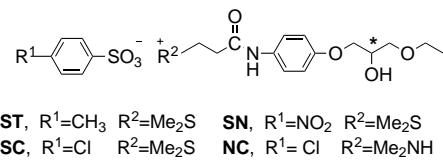
Eingegangen am 29. Mai 1998 [Z11913]

Stichwörter: Aptamere • DNA-Enzyme • In-vitro-Selektion • Kombinatorische Chemie • Nucleotide

- [1] Ligandenbindende Nucleinsäuren: a) S. E. Osborne, A. D. Ellington, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 349–370; b) M. Famulok, J. W. Szostak, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1001–1011; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 979–988; c) L. Gold, B. Poliskiy, O. Uhlenbeck, M. Yarus, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 763–797.
- [2] Katalytische Nucleinsäuren: a) R. R. Breaker, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 371–390; b) R. R. Breaker, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 26–31; c) J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 103–110.
- [3] Katalytische DNA: a) R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 223–229; b) B. Cuenoud, J. W. Szostak, *Nature* **1995**, *375*, 611–614; c) R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 655–660; d) C. R. Geyer, D. Sen, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 579–593; e) S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4262–4266; f) P. Burgstaller, M. Famulok, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1303–1306; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1189–1192; g) D. Faulhammer, M. Famulok, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2984–2988; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2837–2841; h) D. Faulhammer, M. Famulok, *J. Mol. Biol.* **1997**, *269*, 188–202; i) Y. Li, D. Sen, *Nature Struct. Biol.* **1996**, *3*, 743–747; j) J. Burmeister, G. von Kiedrowski, A. D. Ellington, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1379–81; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1321–1324; k) N. Carmi, L. A. Shultz, R. R. Breaker, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 1039–1046; l) N. Carmi, H. R. Balkhi, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 2233–2237.
- [4] a) B. E. Eaton, W. A. Pieken, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 837–63; b) B. E. Eaton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 10–16; c) G. J. Crouch, B. E. Eaton, *Nucleosides Nucleotides* **1994**, *13*, 939–44; d) T. M. Dewey, A. Mundt, G. J. Crouch, M. C. Zyzniewski, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8474–8475; e) T. M. Dewey, M. C. Zyzniewski, B. E. Eaton, *Nucleosides Nucleotides* **1996**, *15*, 1611–1617; f) C. Tu, C. Keane, B. E. Eaton, *Nucleosides Nucleotides* **1995**, *14*, 1631–1638; g) P. A. Limbach, P. F. Crain, J. A. McCloskey, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2183–2196; h) H. Aurup, D. M. Williams, F. Eckstein, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9636–9641.
- [5] a) T. W. Wiegand, R. C. Janssen, B. E. Eaton, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 675–683; b) T. M. Tarasow, S. L. Tarasow, B. E. Eaton, *Nature* **1997**, *389*, 54–57.
- [6] J. A. Latham, R. Johnson, J. J. Toole, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2817–2822.
- [7] J. Smith, E. V. Anslyn, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1956–1958; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1879–1881. Diese Autoren stellen fest (Zitat): „Bislang sind die Verfahren zur Selektion solcher Aptamere

- meist auf unmodifizierte DNA und RNA beschränkt, weil Polymerasen die meisten chemisch modifizierten Mononukleotide nicht tolerieren und daher das Selektionsverfahren beim Einbau solcher Nukleotide bereits nach einer Amplifikationsrunde abbricht.“
- [8] A. F. Cook, E. Vuocolo, C. L. Brakel, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4077–4095.
- [9] T. Kovács, L. Ötvös, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4525–4528.
- [10] **3** wurde schon früher aus Desoxyuridintriphosphat (dUTP) synthetisiert. Diese Methode bringt aber hohe Kosten für dUTP und Probleme mit Nebenprodukten mit sich. P. R. Langer, A. A. Waldrop, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 6633–6637.
- [11] Einige Derivate von **3** waren geeignete Substratanaloga von dTTP für *E. coli*-DNA-Polymerase und gut verwendbar bei der Nick-Translation und bei Random-priming-Synthesen. Ein homogener Einbau dieser Derivate durch PCR ist wegen Kettenabbruchs nicht möglich. Siehe Lit. [11c] für den Einsatz von Derivaten in der PCR. a) M. Shimkus, J. Levy, T. Herman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 2593–2597; b) B. L. Iverson, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1241–1243; Lit. [10]; c) H. Yu, J. Chao, D. Patek, R. Mujumdar, A. S. Waggoner, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3226–3232.
- [12] Die PCR-Produkte mit den modifizierten Nukleotidanaloga wurden in den Vektor pCR2.1TOPO kloniert, wobei der Topoisomerase-aktivierte Vektor des Herstellers (Invitrogen) verwendet wurde.
- [13] S. Nesbitt, L. A. Hegg, M. J. Fedor, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 619–630.
- [14] Übersichtsartikel über die Strukturen von ligandenbindenden Nukleinsäuren beschreiben ausführlich die Unterschiede zwischen den Ligandenbindungsstellen von Nukleinsäuren und Proteinen: a) K. A. Marshall, M. P. Robertson, A. D. Ellington, *Structure* **1997**, *5*, 729–734; b) M. Egli, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 494–497; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 480–482; c) D. J. Patel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 32–46; d) J. Feigon, T. Dieckmann, F. W. Smith, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 611–617.

SC^[3] und (\pm) -**SN**^[4]), obwohl diese Art der Enantiomerentrennung über ein Jahrhundert lang, seit der mechanischen Trennung enantiomerer Konglomerate (einer Mischung von (+)- und (-)-Kristallen einer Verbindung) durch Pasteur^[5] und der Entdeckung der Technik der „bevorzugten Kristallisation“ durch Gernez^[6,7] im Prinzip für undurchführbar gehalten wurde. Wir bezeichnen dieses neue Phänomen der Racematspaltung als „bevorzugte Anreicherung“ in der Mutterlauge.



Diese bevorzugte Anreicherung hat folgende Merkmale:
1) Wiederholtes Umkristallisieren des Racemats und jeder Fraktion der resultierenden abgeschiedenen Kristalle führt zu einer bemerkenswerten abwechselnden Anreicherung der beiden Enantiomere bis zu einem Enantiomerüberschuss (*ee*) von 100% in den Mutterläugen (Enantiomeranreicherung in der Mutterlauge). 2) Wenn nichtracemische Mischungen mit geringen *ee*-Werten umkristallisiert werden, weisen die resultierenden abgeschiedenen Kristalle stets die entgegengesetzte Chiralität auf (Chiralitätsumkehr bei den abgeschiedenen Kristallen)^[1–4] (Abb. 1). Eine Röntgenstrukturanalyse der racemischen Einkristalle (0% *ee*) von **ST** und **SC**

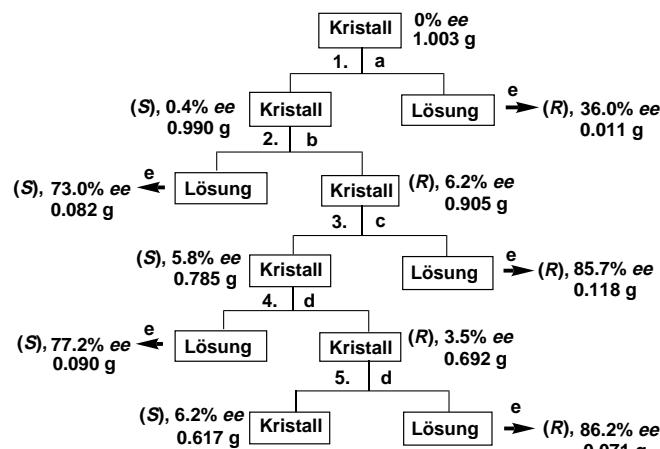


Abb. 1. Bevorzugte Anreicherung von **NC**. Die Kristalle wurden unter Erhitzen in EtOH gelöst. Die gesättigte Lösung wurde auf 25 °C abgekühlt, bis zur beginnenden Kristallisation gerührt und dann für die angegebene Zeitspanne stehen gelassen. Kristallisationsbedingungen: a) EtOH (10 mL), 25 °C, 17 d; b) EtOH (10 mL), 25 °C, 5 d; c) EtOH (10 mL), 25 °C, 3 d; d) EtOH (8 mL), 25 °C, 3 d; e) Verdunsten des Lösungsmittels. Die *ee*-Werte der Mutterlägen und der Kristalle wurden durch HPLC-Analyse unter Verwendung einer Säule mit chiraler stationärer Phase (Chiralcel OD-H, 0.46 × 25 cm) und eines Gemisches von Hexan, EtOH, CF₃COOH und Et₂NH (800/200/5/1) als mobiler Phase bestimmt.

ließ darauf schließen, daß die stabilen kristallinen Formen dieser racemischen Verbindungen jeweils eine regelmäßige Packung des (*R*)- und des (*S*)-Enantiomers im Kristallgitter aufweisen (Raumgruppe $P\bar{1}$, $Z=2$).^[1–3] Außerdem wurde

Ungewöhnliche fehlgeordnete Kristallstruktur eines Racemats als neues Phänomen bei der Racematspaltung: bevorzugte Anreicherung**

Rui Tamura,* Hiroki Takahashi, Ken Hirotsu,* Yoshitaka Nakajima, Takanori Ushio und Fumio Toda

Wir berichteten bereits über den ersten Fall einer erfolgreichen Racematspaltung durch einfaches Umkristallisieren einer Reihe von racemischen Verbindungen (\pm) -**ST**,^[1,2] (\pm) -

[*] Prof. R. Tamura
Graduate School of Human and Environmental Studies
Kyoto University
Kyoto 606-8501 (Japan)
Fax: (+81) 75-753-2957
E-mail: tamura@helios.jinkan.kyoto-u.ac.jp

Prof. K. Hirotsu, Y. Nakajima
Department of Chemistry, Graduate School of Science
Osaka City University, Osaka (Japan)

H. Takahashi
Division of Material Science
Graduate School of Environmental Earth Science
Hokkaido University, Sapporo (Japan)

Dr. T. Ushio
Taiho Pharmaceutical Co., Saitama (Japan)

Prof. F. Toda
Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering
Ehime University, Matsuyama (Japan)

[**] Diese Arbeit wurde vom japanischen Ministerium für Bildung, Wissenschaft, Sport und Kultur gefördert.